

Bedeutung *cis*-aktiver Elemente für die Expression des
Gruppenspezifischen Antigens GAG des Humanen
Immundefizienz Virus HIV-1

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III-BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Jürgen Kern aus Ebermannsdorf

2001

Promotionsgesuch eingereicht am:	24. Juli 2001
Die Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. Susanne Modrow
Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. R. Schmitt (Vorsitzender) Prof. Dr. S. Modrow (1. Gutachter) Prof. Dr. E.Holler (2. Gutachter) Prof. Dr. A.Kurtz (3. Prüfer)

Zusammenfassung

Das Humane Immundefizienz-Virus hat eine globale Epidemie verursacht, deren Ausmass sich viel weitreichender entwickelt hat, als dies noch vor zehn Jahren geschätzt wurde. In den letzten Jahren intensiver Forschung wurden verschiedene Therapieansätze entwickelt, und es ist heute möglich den Gesundheitszustand Infizierter durch Kombinationstherapien zu verbessern und deren Lebenserwartung deutlich zu verlängern. Jedoch verursachen diese Medikamente erhebliche Nebenwirkungen, die Gefahr der Ausprägung von Virusresistenzen ist gross und die Massnahmen beschränken sich wegen enorm hoher Therapiekosten fast ausschliesslich auf Industrienationen. Besondere Bedeutung gilt daher der Entwicklung von präventiven Impfstoffen und von Medikamenten gegen neue virale Zielstrukturen. Vor allem für die Virusreplikation essentielle, konservierte Bereiche, wie z.B. Gag kommen in Betracht, da sich hier wichtige Epitope zur Impfstoffentwicklung befinden. Das Rev/RRE-System stellt einen weiteren sensiblen Bereich dar, weil hier Schnittstellen zu zellulären Transportproteinen existieren, deren Interaktionsbereiche durch die zielgerichtete Entwicklung von Hemmstoffen blockiert werden könnten. Der Rev/RRE abhängige Exportmechanismus ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden die Zusammenhänge des Rev-Protein abhängigen Exports viraler mRNS am Beispiel des *gag*-Gens untersucht. Die Entwicklung eines geeigneten Luziferase-Reporter-Systems ermöglichte die Untersuchung der Bedeutung cis-aktiver Elemente des HIV-Genoms auf den Export von *gag*-mRNS. Die daraus gewonnenen Zusammenhänge wurden ferner in einem autologen Gag-Expressionssystem verfolgt. Das RRE-Motiv im *env*-Gen, an dem Rev-Protein spezifisch bindet, hatte in dem hier etablierten Testsystem mit 330 Basen die optimale Länge. Weitere benachbarte Sequenzbereiche enthielten keine Abschnitte, die diese Rev-Funktion beeinflussten. Die in der für Gag kodierenden Sequenz lokalisierten INS-Elemente reduzierten den mRNS-Export und waren eine notwendige Voraussetzung für die Rev-Funktion. Eine unmittelbar oberhalb des *gag*-Startkodons gelegene Spleiß-Donorstelle erwies sich als entscheidendes Motiv für die *gag*-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart des Spleißdonors die Gag-Synthese stark erhöht war, während die Punktmutation dieser Spleißstelle die Synthese praktisch vollständig ausschaltete. Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen neue Wege für eine effiziente *gag*-Expression und könnten sich hilfreich für die Entwicklung einer DNS-Vaccine erweisen. Die Beobachtungen stehen in Einklang mit bisher veröffentlichten Daten zur Regulation des mRNS-Exportes durch Rev-Protein. Die modellhafte Vorstellung der Bedeutung cis-aktiver Sequenzen in Verbindung mit der Rev-Funktion für den mRNS-Export tragen zu einem genaueren Verständnis dieser Zusammenhänge bei.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	VI
EIN-BUCHSTABEN-CODE DER AMINOSÄUREN & DNS-BASEN.....	X
A. EINLEITUNG	1
A.1. GESCHICHTLICHER RÜCKBLICK UND PHYLOGENIE DES HI-VIRUS	1
A.2. ORGANISATION DES HIV-1 VIRUSGENOMS UND FUNKTION DER GENPRODUKTE.....	2
A.3. REPLIKATIONSZYKLUS VON HIV-1	4
A.4. IMMUNOLOGISCHE BEDEUTUNG DES GRUPPENSPEZIFISCHEN ANTIGENS.....	7
A.5. DAS HIV-1 TRANSPORTER-PROTEIN REV	9
A.5.1. <i>Struktur und Funktion</i>	9
A.5.2. <i>Bindung von Rev an die RNS-Schleifenstruktur RRE</i>	12
A.6. MECHANISMEN ZUR POSTTRANSKRIPTIONELLEN REGULATION DER HI-VIRALEN GEN- EXPRESSION	15
A.6.1. <i>RNS-assoziierte Regulationsmechanismen</i>	15
A.6.2. <i>Rev-vermittelter Kernexport</i>	15
A.6.3. <i>Kernretention viraler mRNS</i>	16
A.7. ZIELSETZUNG	18
B. MATERIAL UND METHODEN	20
B.1. MATERIAL.....	20
B.1.1. <i>Puffer</i>	20
B.1.2. <i>Bakterien</i>	20
B.1.3. <i>Nukleinsäuren</i>	21
B.1.3.1. HIV-1 Wildtyp Stamm.....	21
B.1.3.2. Reporterplasmide	22
B.1.3.3. Plasmide zur Expression von Fremdgenen	22
B.1.3.4. Hergestellte Konstrukte für Reporter- und Expressionsstudien.....	23

B.1.3.5.	Oligonukleotide	25
B.1.4.	Nährmedien	29
B.1.5.	Eukaryotische Zelllinien	29
B.1.6.	Virusstämme	30
B.1.7.	Antikörper und Antiseren	30
B.1.8.	Computerprogramme und Datenbanken	30
B.2.	METHODEN	31
B.2.1.	Klonierungen in <i>E.Coli</i>	31
B.2.1.1.	Herstellung und Reinigung von Oligonukleotiden	31
B.2.1.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
B.2.1.3.	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	32
B.2.1.4.	Standardmethoden zur Modifikation von DNS	33
B.2.1.5.	Isolierung genomischer DNS aus Eukaryontenzellen	36
B.2.2.	Analyse rekombinanter Proteine	37
B.2.2.1.	Herstellung von Zell-Lysaten	37
B.2.2.2.	Quantitative Proteinbestimmung	37
B.2.2.3.	Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
B.2.2.4.	Western-Blot Analyse	38
B.2.2.5.	Nachweis des zytoplasmatischen HIV-1 p55 Antigens im ELISA-Format ..	40
B.2.2.6.	Immunfluoreszenz	40
B.2.3.	Zellkultur Techniken	40
B.2.3.1.	Bestimmung der Lebendzellzahl	40
B.2.3.2.	Kultivierung von adherent wachsenden Zellkulturen	41
B.2.3.3.	Kultivierung von Suspensionskulturen	41
B.2.3.4.	Transfektion von eukaryotischen Zellen	41
B.2.3.5.	Ermittlung der Transfektionseffizienz	42
B.2.4.	Techniken zur Untersuchung der Regulation des mRNA-Exports und der	
Translation		44
B.2.4.1.	Dual Light Luziferase Assay	44
B.2.4.2.	Northern-Blot Analyse von isolierter Luziferase-RNS aus transfizierten	
Zellen		45

C. ERGEBNISSE	50
C.1. TRANSKRIPTION UND MRNS-EXPORT VON HIV-1 <i>GAG</i> -GEN-SEQUENZEN	50
C.1.1. <i>Ein Luziferase Reporter Assays zur Messung des nukleären mRNS-Exportes</i>	50
C.1.1.1. Klonierung von RRE- <i>gag</i> Gensequenzen in das pGL-c Reporterplasmid ...	51
C.1.1.2. Aktivität der Luziferase-Reporterkonstrukte	57
C.1.1.3. Immunhistochemischer Nachweis der <i>rev</i> -Expression in transfizierten HeLa-Zellen	62
C.1.2. <i>Northern-Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer mRNS Fraktionen transfizierter Zellen.....</i>	63
C.1.2.1. Charakterisierung der nukleären und zytoplasmatischen mRNS.....	63
C.1.3. <i>Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur Transkription und mRNS-Export von HIV-1 Sequenzabschnitten</i>	65
C.2. EINFLUSS VON NICHT TRANSLATIERTEN BEREICHEN AUF DIE LUZIFERASE-REPORTER- AKTIVITÄT	66
C.2.1.1. Untersuchung nicht kodierender HIV-Sequenzen im Reporterassay	66
C.2.1.2. Klonierung der Luziferase-NTR <i>gag</i> -RRE Reporterkonstrukte	66
C.2.1.3. Transfektionen in HeLa-Zellen.....	68
C.2.2. <i>Kurzzusammenfassung zur Bedeutung von Spleißstellen auf die Expression des Luziferase-Reporters.....</i>	70
C.3. ETABLIERUNG VON B-ZELLINIEN ZUR EXPRESSION VON HIV-1 <i>GAG</i> -PROTEIN- FRAGMENTEN	70
C.3.1. <i>Klonierung und Charakterisierung von HIV-1 Gag Expressionsplasmiden</i>	71
C.3.2. <i>Bakterielle Expression der HIV-1 gag-Gensequenzen.....</i>	73
C.3.3. <i>Expression der gag-Gensequenzen in eukaryotischen Zellen.....</i>	74
C.3.3.1. Transfektion von B-Zellen	74
C.3.3.2. Transfektion von HeLa-Zellen.....	76
C.3.3.3. Northern-Blot Analyse zum Nachweis von HIV-1 <i>gag</i> -Transkripten.....	76
C.3.4. <i>Plasmidisolierung aus stabil transfizierten B-Zellkulturen</i>	78
C.3.5. <i>Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur Rev-Protein unabhängigen Expres- sion von HIV-1 Gag-Proteinfragmenten</i>	79
C.4. TRANSIENTE EXPRESSION VON HIV-1 <i>GAG</i> IN COS7-ZELLEN	80
C.4.1.1. Klonierung von <i>gag</i> -RRE in pcDNA3.....	80
C.4.1.2. Expression von Gag	83

C.4.2.	<i>Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur transienten Expression von HIV-1 Gag in Cos7-Zellen</i>	87
D.	DISKUSSION	88
D.1.	ENTWICKLUNG EINES REPORTER-ASSAYS ZUR BESTIMMUNG DES REV-ABHÄNGIGEN MRNS EXPORTES VON <i>GAG</i> -TRANSKRIPTEN	88
D.2.	EINFLUSS VON SEQUENZBEREICHEN DES HIV-GENOMS AUF DEN MRNS-EXPORT.....	89
D.2.1.	<i>Rolle der RRE-benachbarten Sequenzregion</i>	90
D.2.2.	<i>Rolle der INS in gag</i>	91
D.2.3.	<i>Rolle der Haupt-Spleißdonorstelle stromaufwärts von gag</i>	93
D.3.	EXPRESSION VON GAG-PROTEIN IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	94
D.3.1.	<i>Expression von gag-Sequenzabschnitten in B-Zellen</i>	95
D.3.2.	<i>Die Bedeutung von Spleißstellen für die Expression von Gag</i>	96
D.4.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	98
E.	LITERATURVERZEICHNIS	100

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Absorption oder Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom (aquired immunodeficiency syndrome)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid-Protein
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocytes)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
d	desoxy
dam	Methylierungsdefekt in <i>Escherichia coli</i> (dam-Methylase)
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DMEM	Dulbeco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E	Extinktion
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titriplex III)

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Env	Hüllprotein (envelope)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
His	Histidin
HIV-1/2	humanes Immundefizienz-Virus Typ 1/2
HLA	humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
H ₂ O _{depc}	H ₂ O bidest. mit DEPC behandelt
HTLV-1	humanes T-Zell lymphotrophes Virus Typ I
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
k	kilo
Kana	Kanamycin
kBp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
lac-	Defekt im Laktose-Operon von <i>E. coli</i>
lacI	Gen für den Repressor des Laktose-Operons
lacZ	Gen für β -Galaktosidase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LTR	long terminal repeat
M	Molar (Mol pro Liter)
m	Meter oder milli
MA	Matrix-Protein
mA	Milliampere

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major-histocompatibility complex)
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS (messenger)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MW	Molekulargewicht
N	Normal
n	nano (10 ⁻⁹)
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
NC	Nukleokapsid
Nef	negative factor
NH ₂ -Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutmonozyten
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain reaktion)
Pen	Penicillin
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
pmol	picomol
pol	Polymerase (Enzymfunktionen)
pr	Protein
PR	Protease
Psi	Verpackungssequenz
recA	Gen für das RecA Protein
Rev	regulator of expression of viral proteins
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (radiants per minute)
RRE	rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor

SD	Spleißdonor
SDS	Natrium Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sek.	Sekunde
SIV	Affen-Immundefizienz-Virus
SP-1	Transkriptionsfaktor
SP6	Promoter des Phagen SP6
SSC	Natriumzitrattpuffer
Std.	Stunde(n)
Strep	Streptomycin
T3	Promoter des Phagen P3
T7	Promoter des Phagen T7
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	tat activating region
Tat	transactivator of transcription
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris/Kochsalz-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
t-RNS	Transfer-RNS
U	Enzym-Einheit (Units)
UV	ultraviolett
V	Volt
vif	viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virus-ähnliches Partikel (virus-like particle)
Vol.	Volumen
vpr	virales Protein R
vpu	virales Protein U
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit (volume per volume)
W	Watt

WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit (weight per volume)
z.B.	zum Beispiel

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren & DNS-Basen

A Alanin	L Leucin	R Arginin	K Lysin
N Asparagin	M Methionin	C Cystein	F Phenylalanin
Q Glutamin	P Prolin	E Glutaminsäure	S Serin
G Glycin	T Threonin	H Histidin	W Tryptophan
I Isoleucin	Y Tyrosin	D Asparaginsäure	V Valin
A Adenin	C Cytosin	G Guanin	T Thymin
U Uracil (RNS-Basen)			

A. Einleitung

A.1. Geschichtlicher Rückblick und Phylogenie des HI-Virus

1978 erkrankte in Paris ein Taxifahrer, der längere Zeit in Angola gelebt hatte, an einer seltenen Form der Lungenentzündung. Als 1981 in den USA das *Center for Disease Control and Prevention* von weiteren Fällen dieser *Pneumocystis carinii* bei homosexuellen Männern berichtete, wurde von den drei Pariser Spezialisten Rozenbaum, Leibowitch und Mayaud erstmals die Theorie vertreten, dass es sich hierbei um eine neue, sich international schnell ausbreitende Krankheit handeln könnte. Diese Vermutung wurde bestätigt als 1983 Montagnier und Gallo ein neues Retrovirus aus Lymphknoten von an Immundefizienz leidenden Patienten isolierten (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984). Dieses Virus wurde als Auslöser der erworbenen Immundefizienz-Erkrankung (AIDS) identifiziert und erhielt 1986 seinen heutigen Namen Humanes Immundefizienz Virus (HIV) (Coffin *et al.*, 1986b).

In den vergangenen 20 Jahren, seitdem die ersten AIDS-Fälle in Europa registriert wurden, hat sich die Erkrankung an Immundefizienz in der dritten Welt, allen europäischen Staaten, den USA und den anderen Ländern der westlichen Welt stark ausgebreitet. Nach Schätzungen der Vereinten Nationen haben sich mittlerweile weltweit ca. 58 Mio. HIV-1 Infektionen seit dem Beginn der Epidemie ereignet. 22 Mio. Menschen sind bereits an den Folgen der Immundefizienz gestorben. Epidemiologen der Organisation UN AIDS beziffern dabei die Zahl der Neuinfektionen allein im Jahr 2000 auf ca. 5,3 Mio. (HIV Infections and AIDS 2000; UNAIDS/WHO 2000). Seit Beginn der Ausbreitung von HIV-1 haben sich in Europa und den USA bei etwa 800.000 Menschen die durch das Virus verursachten Symptome der Immundefizienz manifestiert. Ca. 700.000 dieser Fälle wurden in den USA registriert, in der BRD wurden bisher ca. 17.000 AIDS-Kranke gemeldet. Durch die politische und soziale Öffnung der osteuropäischen Staaten kam es dort ebenso wie in vielen asiatischen Ländern in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg von HIV-Infektionen. So erhöhte sich beispielsweise die Zahl HIV-Infizierter in der Ukraine im Zeitraum von 1995 bis 1997 um das sechsfache (Pavlakis, 1998). Die meisten HIV-positiven Menschen leben aber wahrscheinlich auf dem afrikanischen Kontinent, vor allem in den Staaten Kenia, Südafrika, Uganda, Botswana und Zimbabwe. Versäumnisse in der Aufklärung der Bürger über die Gefahren, die von HIV ausgehen, Mängel in der medizinischen Versorgung, sowie die mangelnde Schulbildung eines

Großteils der Bevölkerung, führten dazu, dass nach vorsichtigen Schätzungen in Südafrika bereits jeder achte, in Botswana und Zimbabwe bereits jeder vierte Mensch HI-Virussträger ist (Balter, 1998). Diese alarmierenden Zahlen verdeutlichen, wie notwendig die Fortführung der intensiven Forschung nach geeigneten Impfstoffen zur Vorsorge und die Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten zur Behandlung bereits infizierter Menschen ist. Hierfür ist das Verständnis der komplizierten Regulationsmechanismen, die sich das HI-Virus für seine Verbreitung zu Nutzen macht, von entscheidender Bedeutung.

HIV gehört zur Familie der Retroviridae und bildet mit den Vertretern HIV-1 und HIV-2 die Gruppe der humanpathogenen Lentiviren (Kanki *et al.*, 1986; Coffin *et al.*, 1986a). Die weitere Unterteilung von HIV-1 in die Subtypen A bis I und O und bei HIV-2 in die Subtypen A und B bezieht sich auf Abweichungen der Subtypen in der Zusammensetzung des *env*-Gens, das für die Virus-Hüllproteine kodiert. Bei Lentiviren kommt es nach der Infektion meist erst nach mehreren Jahren einer latenten Phase (lateinisch *lenti*=langsam) allmählich zum Ausbruch der Krankheit und zur Manifestation der Symptome. Diese äußern sich im Falle von HIV in Immundefizienz-Erscheinungen, die durch eine Reduktion der Anzahl an CD4⁺-T-Helferzellen ausgelöst werden. Die Zytomegalie-Virusinfektion, das Kaposi-Sarcom und Lymphome sind die am häufigsten auftretenden opportunistischen Krankheitsbilder (Gottlieb, 1986).

Während HIV-1 Infektionen praktisch in der gesamten westlichen Welt auftreten, wird die Verbreitung von HIV-2 hauptsächlich in dem westlichen Teil des afrikanischen Kontinents beobachtet (Clavel *et al.*, 1986). Die Unterschiede in der genomischen Sequenz zwischen HIV-1 und HIV-2 sind größer als zwischen dem homologen Lentivirus der Primaten - dem Affen-Immundefizienz Virus (SIV) - und HIV-2, woraus sich Rückschlüsse auf Verwandtschaftsgrade und Abstammungsfolgen ergeben (Franchini *et al.*, 1987). Auch gibt es weitere Beobachtungen, die eine Entstehung des humanen Immundefizienz-Virus durch einen Virus-Transfer vom Affen auf den Menschen nahelegen. Dabei liegt eine erste Infektion von Menschen durch den SIV-Erreger möglicherweise bereits 40 Jahren zurück (Hirsch *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1998).

A.2. Organisation des HIV-1 Virusgenoms und Funktion der Genprodukte

Alle Retroviren, einschließlich der Lentiviren, besitzen ein Plusstrang-RNS-Genom. Es besteht aus zwei identischen RNS-Molekülen, die jeweils ca. 9200 Basen lang und an ihren 5'-Enden durch Watson-Crick Basenpaarung verknüpft sind (Marquet *et al.*, 1991; Sakuragi *et al.*, 2001)

Ihre 3'-Enden sind, wie bei eukaryotischen mRNA-Molekülen üblich, polyadenyliert, die 5'-Enden weisen eine Cap-Struktur auf. Bevor es zur Integration des Virusgenoms in der Wirtszelle kommen kann, muss das RNS-Genom durch die viruseigene reverse Transkriptase in ein doppelsträngiges DNS-Genom umgeschrieben werden. Über die an beiden Enden des Genoms lokalisierten LTR-Bereiche findet anschließend der Integrationsprozess statt.

Ein Überblick über das Genom der Retroviren ist in Abb. 1 dargestellt. Es umfasst drei essentielle strukturelle Gene: *gag*, *pol* und *env*. Darüberhinaus besitzt die Gruppe der Lentiviren noch zusätzliche Gene zur Regulation der proviralen Replikation, Tat, Rev und Nef. Bei anderen Retroviren werden diese entweder anders genannt oder fehlen gänzlich, wie dies bei einfacheren Typ C- oder D-Retroviren der Fall ist (Cullen, 1992).

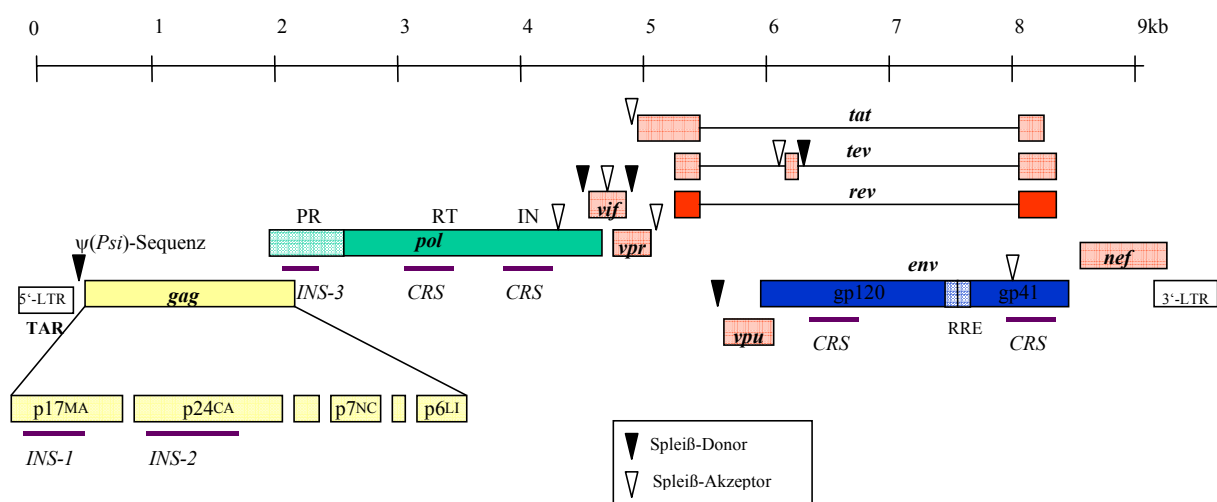


Abb. 1 Schematischer Aufbau des Genoms von HIV-1. Die Sequenz für das gruppenspezifische Antigen (*gag*) zeigt in der Vergrößerung die funktionellen Bereiche, die für das p17-Matrixprotein, das p24-Kapsidprotein, das p7-Nukleokapsidprotein und das p6-Linkprotein kodieren. Die Lage der inhibitorischen oder auch *cis* aktiven repressiv genannten Sequenzen (INS bzw. CRS), die über alle Sequenzbereiche für die strukturelle Proteine verteilt sind, wurden von Rosen et al, 1988, Schwartz et al, 1992 und Schneider et al, 1997 beschrieben. Die Spleißdonor und -Akzeptorstellen sind mit schwarzen und weißen Dreiecken angegeben (ψ(Psi) Sequenz: Verpackungssignal des ungespleißten RNS-Genoms, TAR: Tat activating region, *gag*: gruppenspezifisches Antigen, *pol*: Polymerase-Leserahmen, IN: Integrase, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, *env*: Envelope, *tat*: transactivator of transcription, *rev*: regulator of viral proteins, *tev*: Spleißprodukt aus *tat* und *rev*, RRE: Rev-resonsive element, Vif: virion infectivity factor, Vpr: viral protein R, Vpu: viral protein U, Nef: negative factor, LTR: long terminal repeat, der sich aus den Regionen U3, R und U5 zusammensetzt).

Das HIV-Genom kodiert ferner für die Genprodukte Vif, Vpu und Vpr, die aber in Zellkulturexperimenten für den Mechanismus der Virusreplikation entbehrlich sind (Broder *et al.*, 1990). Vif-Protein beeinflusst die Infektiosität von Viruspartikeln (Aiken *et al.*,), Vpu die Partikelfreisetzung (Cohen *et al.*, 1990) und Vpr-Produkte sind sowohl an der Kernlokalisation des Präintegrationskomplexes als auch an Genregulationsprozessen in der Wirtszelle beteiligt.

Für die Produktion der verschiedenen Virusstrukturproteine bedient sich HIV unterschiedlicher komplexer Strategien. Zunächst erfolgt die Produktion von Vorläuferproteinen, die während und nach der Virusfreisetzung proteolytisch prozessiert und in die strukturellen und enzymatischen Genprodukte gespalten werden (CA, MA, NC, PR, IN, RT, gp120, gp41). Dabei wird die Pol-Synthese durch ribosomale Leserasterverschiebungen, die bei der Translation nur mit 5 % Wahrscheinlichkeit im 3'-terminalen Bereich des Gag-Leserahmens auftreten reguliert. Pol wird ausschließlich als Fusionsprotein mit Gag (Gag-Pol-Vorläufer) synthetisiert, da ein Startkodon fehlt (Jacks *et al.*, 1988). Spleißprozesse und die Unterdrückung des suboptimale Startkodon für Vpu ermöglichen die Synthese der Env-Hüllproteine (Schwartz *et al.*, 1990b). Schließlich tragen auch alternative Spleißprozesse des einzigen Primärtranskriptes oder die multicistronische Produktion von Proteinen zu der hohen Organisation des HIV-Genoms bei. Letztere Mechanismen treffen sowohl für alle regulatorischen als auch akzessorischen Gene von HIV-1 zu (Purcell & Martin, 1993).

A.3. Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 lässt sich in folgende Schritte einteilen: Die Rezeptor vermittelte Bindung des Virions an die Zielzelle, die Fusion mit der Wirtszellmembran, die reverse Transkription des RNS-Genoms, die Integration der viralen DNS ins Wirtszellchromosom, die provirale Transkription und Translation und zuletzt die Bildung der Virus-partikel mit abschließender Freisetzung und Reifung. In Abb. 2 sind diese Schritte schematisch dargestellt.

Der Eintritt von HIV in die Wirtszelle erfolgt über die Interaktion des Virus-Hüllproteins Env gp120 mit dem Membran-Glykoprotein CD4, einem natürlichen Proteinrezeptor auf der Zellmembran von T-Helferzellen und Makrophagen. Anschließend findet die durch gp41 vermittelte Fusion mit der Wirtszellmembran statt (Bour *et al.*, 1995). Der CD4-Rezeptor alleine ist jedoch nicht ausreichend für eine erfolgreiche Aufnahme des Virions (Dragic *et al.*, 1996). Es existiert hierfür ein zweiter Rezeptor, der durch eine konformelle Umlagerung von gp120 mit dessen variabler Domäne (V3) interagiert. Dieser sekundäre Rezeptor gehört zur Klasse der

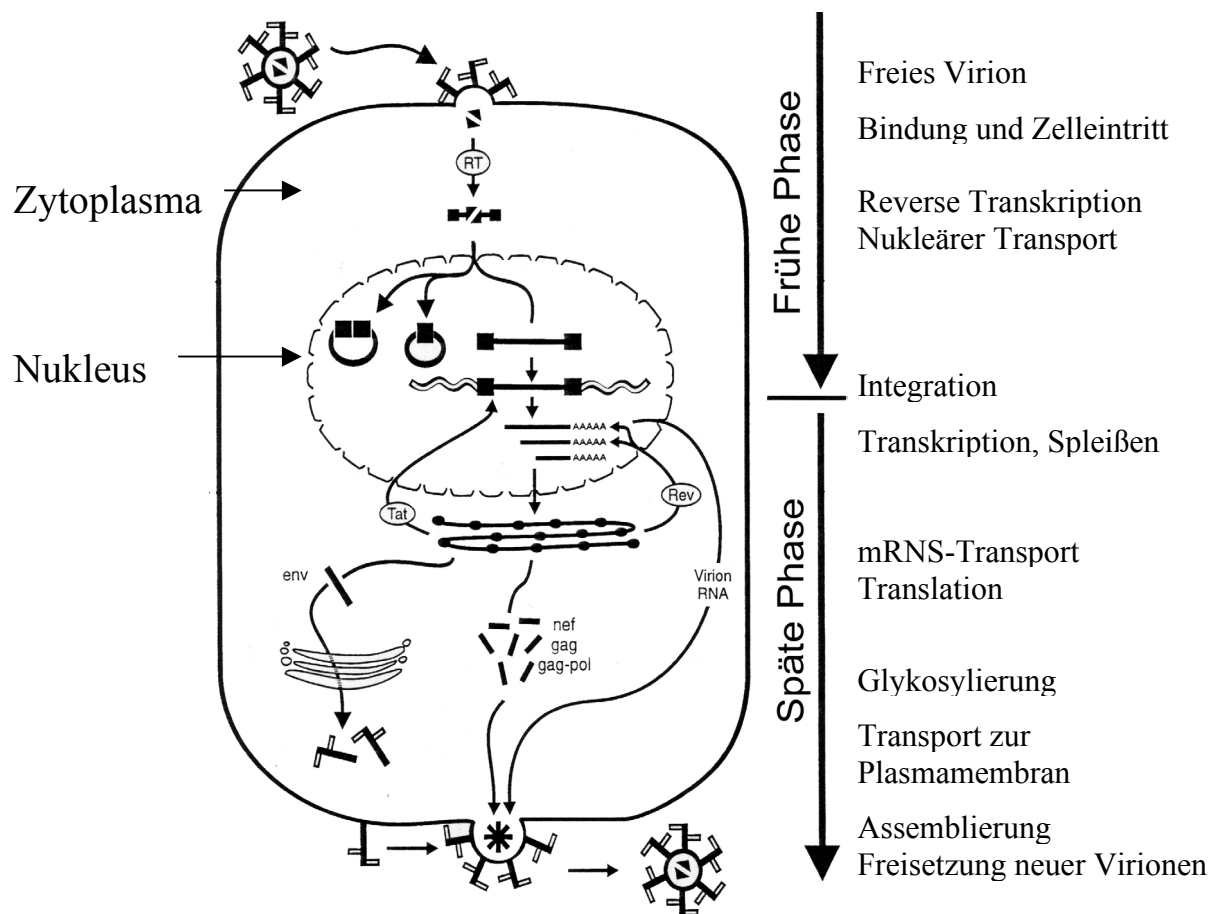


Abb. 2 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1. Verändert nach Folks & Hart. (Folks & Hart, 1997)

Chemokinrezeptoren. Bei makrophagotrophen Virusstämmen ist es der CCR-5-Rezeptor (Deng *et al.*, 1996), bei T-zelltrophen Stämmen ist es der CXCR-4 Rezeptor (Feng *et al.*, 1996).

Durch die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran kommt es zur Freisetzung des Viruskapsids und der retroviralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) (Perez *et al.*, 1992). Wahrscheinlich gebunden an strukturelle Kompartimente erfolgt nun das Umschreiben des RNS-Genoms in cDNS durch die RT (Zhang *et al.*, 1993). Hierbei kommt es, bedingt durch die Ungenauigkeiten von RT und der RNS-Polymerase-II, zu Mutationen in der synthetisierten cDNS und in der Konsequenz zu veränderten Genprodukten. Neuere Studien haben ergeben, dass während der klinisch latenten Phase der Infektion jeden Tag ca. 10^9 infizierte Zellen sterben und erneuert werden. Vorausgesetzt, dass nur 10^9 neue Zellen durch freigesetzte Virionen infiziert werden, ereignet sich bei einer durchschnittlichen Mutationsrate von 1:100.000 Basen und einer Genomlänge von 10 kb jede mögliche Basenmutation 10.000 mal

pro Tag (Coffin, 1996). Diese Variabilität ermöglicht es dem Virus, der Immunantwort des Wirts oder Wirkstoffen gegen HIV zu entkommen und resistente Varianten zu bilden.

Zu einem Präintegrationskomplex assoziiert, der sich aus bereits synthetisierter cDNS, der RT, der IN, Vpr, dem p17 Matrixprotein und dem p7-Nukleokapsidprotein zusammensetzt, wird die virale Information in den Zellkern transportiert (Cann & Karn, 1989; Heinzinger *et al.*, 1994). Dabei spielen die am N-Terminus des Matrixproteins gelegene Kernlokalisationssequenz sowie vermutlich auch Protein-Phosphorylierungsvorgänge (Bukrinsky *et al.*, 1992; Burnette *et al.*, 1993) eine besondere Rolle. Unabhängig davon, ob es sich um ruhende oder sich teilende Zellen handelt (Bukrinsky *et al.*, 1993), erfolgt mit Hilfe der viralen IN die unspezifische Integration der viralen cDNS in das Wirtschromosom. Mit der nun proviral vorliegenden Virus-DNS beginnt der späte Teil der Virusreplikation. Die provirale DNS ist an beiden Seiten von LTR-Bereichen flankiert. Die Transkription wird am 5'-LTR initiiert und unter Verwendung der zellulären RNS-Polymerase II und zellulären Faktoren auf einem basalen Level gehalten. Die Bindung von NF- κ B im Promoter-Bereich des LTR führt zur Synthese des regulatorischen Proteins Tat und infolge dessen zur Bindung von TAT an die Tar-Schleifenstruktur auf der synthetisierten RNS (Berkhout *et al.*, 1989). Auf diese Weise wird die effiziente Transkription der HIV-RNS und damit die massive Virusfreisetzung eingeleitet (Gatignol *et al.*, 1991; Jones & Peterlin, 1994). An diesem Prozess sind unter anderem der konstitutiv gebildete zelluläre Transkriptionsfaktor SP1 (Widlak *et al.*, 1997) und der Transkriptionsfaktor II-D (TF II-D) beteiligt. Die frühen Transkripte kodieren für die regulatorischen Genprodukte Nef, Rev und Tat. Ihre Expression ist von essentieller Bedeutung für die Regulation der Transkription und somit der Virusreplikation. Als erstes virales Protein akkumuliert Nef in infizierten Zellen und senkt die Produktion des CD4-Rezeptors, um die Zelle vor Superinfektion zu schützen (Aiken *et al.*, 1994). Durch kooperative Bindung an die Rev Responsive Element (RRE) Schleifenstruktur, die im Bereich des env-Transkripts lokalisiert ist (Emerman *et al.*, 1989), multimerisiert das Phosphoprotein Rev an mRNS-Transkripten (Zapp *et al.*, 1991), die für die späten viralen Genprodukte kodieren. Auf diese Weise werden Spleißprozesse verhindert und der Transport ungespleißter Transkripte in das Zytoplasma gefördert. Diese späten Genprodukte sind die strukturellen Proteine Gag, Pol und Env, sowie die akzessorischen Proteine Vpr, Vpu und Vif (Malim *et al.*, 1990). Das gag-Gen kodiert für das pr55-Gag-Vorläuferprotein. Es trägt alle Informationen, die zur Ausbildung partikulärer Strukturen notwendig sind (Gheysen *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1992). Die Vorläuferproteine pr160-GagPol und pr55-Gag werden an freien Ribosomen synthetisiert und kotranslational myristyliert (Bryant & Ratner, 1990). Dadurch wird ihr Transport zur

Zytoplasmamembran gelenkt. Die Translation des Env-Transkriptes erfolgt als gp160 Polyprotein-Vorläufer an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Nach der Glykosylierung im ER wird gp160 im Trans-Golgi-Netzwerk in die Untereinheiten gp120 und gp41 gespalten (Dewar *et al.*, 1989). Die Spaltprodukte lagern sich in der Wirtszellmembran zu Trimeren von Heterodimeren zusammen (Shu *et al.*, 2000; Poignard *et al.*, 2001). An bevorzugten Stellen des Zytoplasmas wird durch Akkumulation der pr55-Gag und pr160-GagPol Vorläuferproteine die Knospung der Virionen eingeleitet. Zur gleichen Zeit findet die Interaktion des Nukleokapsidanteils im pr55-Gag-Vorläuferprotein mit der Psi-Sequenz des viralen RNS-Genoms statt. Die Interaktion des Matrixproteinanteils des pr55-Gag-Vorläuferproteins mit dem zytoplasmatischen Anteil von gp41 steuert den gerichteten Einbau der Env-Proteinkomplexe (Yu *et al.*, 1992; Freed & Martin, 1996). Mit der Abschnürung sphärischer Ausstülpungen wird dieser Vorgang abgeschlossen und die noch unreifen Virionen werden freigesetzt (Gelderblom, 1991). Erst gegen Ende der Knospung und kurz danach finden die nun folgenden Reifungsprozesse statt (Kaplan *et al.*, 1994). Die virale Protease spaltet sich autokatalytisch von zuvor dimerisiertem pr160 und beginnt die Polyprotein-Vorläufer zu spalten. Durch Prozessierung des pr55-Gag entstehen dadurch die für den Aufbau der Viruspartikel notwendigen Bestandteile p17-Matrixprotein, p24-Kapsidprotein, p6-Linkprotein und p7-Nukleokapsidprotein. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich die p17-Matrixproteine zu Trimeren (Massiah *et al.*, 1996; Forster *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2000) und die p24-Kapsidproteine zu Dimeren assoziieren (Gamble *et al.*, 1997; Berthet-Colominas *et al.*, 1999; Worthylake *et al.*, 1999) und so die im Elektronenmikroskop erkennbare konische Kapsidstruktur reifer Virionen entsteht. Aus dem pr160-Vorläuferprotein werden durch proteolytische Spaltung neben der PR noch die RT und die IN freigesetzt (Krausslich & Wimmer, 1988). Erst diese Prozessierungsschritte führen zu infektiösen Virionen, die den nächsten Replikationszyklus einleiten können.

A.4. Immunologische Bedeutung des gruppenspezifischen Antigens

Innerhalb eines Infektionszyklus hat keines der HIV Proteine so viele unterschiedliche Funktionen zu erfüllen wie das gruppenspezifische Antigen und seine Spaltprodukte. Unmittelbar nach der Synthese der pr55-Gag Proteine werden diese an die Zytoplasmamembran dirigiert und über eine Myristylierung am N-terminalen Glycin (Freed *et al.*, 1994) in der Plasmamembran verankert. Dort ist pr55-Gag für die Verpackung des RNS Genoms, den geordneten Einbau der Hüllproteine und die Knospung der unreifen Virionen verantwortlich.

Aber nicht nur die Assemblierung und damit die Multimerisierung zu höher geordneten Strukturen wird maßgeblich durch pr55-Gag vermittelt, sondern auch der umgekehrte Prozess, die Disassemblierung, nach der Neuinfektion von Zellen. Zu den Aufgaben von pr55-Gag während der frühen Schritte der Virusvermehrung gehört auch der Transport des Genoms in den Zellkern (Bukrinsky *et al.*, 1993; Haffar *et al.*, 2000). Die Wahrnehmung dieser Vielzahl von Funktionen setzt eine sehr strenge Struktur- und Funktionsrelation voraus, die im Gegensatz zu anderen Proteinen, beispielsweise Env, wenig Raum für Variabilität bietet. Gerade diese Eigenschaft markiert sehr wichtige Ansatzpunkte für mögliche Interventionsmaßnahmen gegen HIV. Das Zinkfingermotiv im Nucleokapsid (Bertola *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2001) oder die Bindung des zellulären Cyclophilin A an p24 (Thali *et al.*, 1994; Braaten & Luban, 2001) sind Beispiele für aktuelle Therapieansätze. Eine wichtigere Bedeutung der Konserviertheit des Proteins wird jedoch für die Entwicklung von Impfstoffen angenommen.

Funktionell bedeutende Regionen von Proteinen weisen generell einen hohen Konservierungsgrad auf. Daher sind in diesen Bereichen häufig wichtige Epitope lokalisiert, die eine schützende Immunantwort induzieren. Mutationen in diesen Bereichen beeinflussen z.B. tertiäre und quartäre Proteinfaltungsvorgänge negativ und wirken sich so zwangsläufig ungünstig auf die jeweilige Funktion des Proteins und folglich auf die Virusvermehrung aus. Im Fall der HIV-Infektion weisen die meisten asymptomatischen Virusträger eine spezifische CTL-Antwort gegen Epitope im Bereich des p17-Matrix- und des p24-Kapsid-Proteins auf (Johnson *et al.*, 1991; Littaua *et al.*, 1991; van Baalen *et al.*, 1993; Klenerman *et al.*, 1994). Sehr häufig werden diese Epitope durch HLA-B8 oder HLA-B27 präsentiert. Insbesondere wird den Epitopen im p24-Kapsid-Protein eine besondere Rolle bei der Immunabwehr zugewiesen, da sich diese in hochkonservierten Bereichen befinden (Buseyne *et al.*, 1993; Riviere, 1994; Nakamura *et al.*, 1997). So enthält beispielsweise die am C-Terminus der p24-Region lokalisierte Haupt-Homologie-Region (MHR) des gruppenspezifischen Antigens Pr55-Gag ein hochkonserviertes, HLA B 27 restringiertes Epitop, das in direktem Zusammenhang mit der Dauer der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion steht (Hoffenbach *et al.*, 1989; McNeil & Gore, 1996). Mutationen in diesem Bereich stören die Stabilisierung von p24 und dessen Dimere, was zu einem negativen Einfluss auf die Infektiosität von HIV führt. Ein weiteres, HLA B14 restringiertes CTL-Epitop, das in einem gesunden Langzeitüberlebenden identifiziert wurde, liegt ebenfalls im C-terminalen Bereich der MHR (Johnson *et al.*, 1994; Harrer *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1999). Alle nichtkonservativen Sequenzvariationen in diesem Epitop führten in Zellkulturexperimenten zu einem Verlust der Infektiosität des Virus, was auf die Bedeutung

dieser Sequenz für die Virusreplikation und deren Kontrolle schließen lässt (Wagner *et al.*, 1998).

Ferner wurde gezeigt, dass p24 nicht nur CTL-Epitope enthält, die von verschiedenen HLA-Typen präsentiert werden und in den meisten infizierten Menschen eine zelluläre Immunantwort hervorrufen, sondern auch mehrere Epitope für eine humorale Immunantwort (Mills *et al.*, 1990; Rosenberg *et al.*, 1997). Andere Epitope, die in weniger konservierten Regionen der HIV-Proteine liegen und ebenfalls eine Immunantwort hervorrufen, verlieren im Gegensatz dazu durch die hohe Variabilität des Virusgenoms bald an Bedeutung für die Bekämpfung der Infektion.

A.5. Das HIV-1 Transporter-Protein Rev

A.5.1. Struktur und Funktion

Rev-Protein wird früh in der Phase der Virusreplikation zusammen mit den Proteinen Tat und Nef gebildet und koordiniert den nukleären Export ungespleißter und einfach gespleißter viraler mRNS, die für die späten Genprodukte kodieren. Diese umfassen die strukturellen Proteine Gag und Env, sowie die viralen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase, die im *pol*-Gen vereinigt sind. Die entsprechenden mRNS-Moleküle weisen die im *env*-Gen von HIV-1 lokalisierte komplexe RRE-Schleifenstruktur (= Rev Responsive Element) auf. Ohne die Unterstützung des Rev-Transporterproteins werden die Transkripte nicht in das Zytoplasma exportiert, sondern im Kern zurückgehalten und abgebaut (Maldarelli *et al.*, 1991; Cochrane *et al.*, 1991). *In vitro* Experimente zeigten, dass die Anwesenheit von Tat und Rev genügt, um in Zellkultur eine Virusvermehrung zu erzielen. Die akzessorischen Proteine Vif, Tef, Nef sind hierfür entbehrlich (Broder *et al.*, 1990). Während Tat-Protein durch seine Bindung an die synthetisierte mRNS die Transkription des Virusgenoms erhöht (Jones & Peterlin, 1994), besteht die Funktion von Rev darin, im Zusammenspiel mit zellulären Faktoren die mRNS-Stabilisierung, den Export von ungespleißter mRNS und deren Translation zu regulieren (Schwartz *et al.*, 1992b).

Das ca. 116 Aminosäuren große Rev-Protein (siehe Abb. 3) hat ein Molekulargewicht von 13 kDa, läuft aber unter denaturierten Bedingungen im SDS-Gel aufgrund seiner besonderen Struktur auf einer Höhe von 19 kDa (Cochrane *et al.*, 1989).

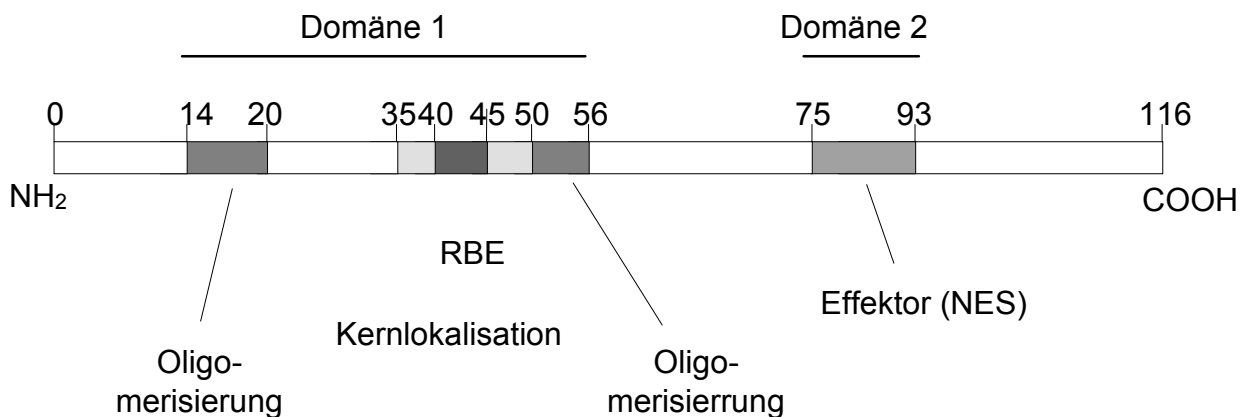


Abb. 3 Schematische Darstellung der Lokalisation der beiden wichtigen Domänen im Rev-Protein. Domäne 1 erstreckt sich von AS 14- AS 56. Die nukleäre Lokalisationssequenz NLS und der für die RRE-Bindung notwendige Bereich werden flankiert von Sequenzen, die für die Oligomerisierung weiterer Rev-Moleküle verantwortlich sind. Die als nukleäres Exportsignal fungierende Effektordomäne (NES=Domäne 2) liegt im karboxyterminalen Bereich des Proteins zwischen den AS 75 bis AS 93.

Es wird durch zwei Exons kodiert, die im Bereich des Env-Gens lokalisiert sind und durch Spleißprozesse zusammengeführt werden. Rev-Protein wird an zwei Serin-Aminosäureresten phosphoryliert (Sodroski *et al.*, 1986; Hauber *et al.*, 1988). Die Phosphorylierung hat zwar *in vitro* keine Auswirkung auf die Funktion von Rev (Cochrane *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1989), jedoch werden auf diese Weise konformelle Umlagerungsprozesse eingeleitet und die mRNS-Bindung beschleunigt. In konfokalen Lasermikroskopiestudien und mit Hilfe von Rev-Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurde gezeigt, das sich Rev vorwiegend in den Nukleoli anreichert (Cullen *et al.*, 1988; Cochrane *et al.*, 1990b; Stauber *et al.*, 1995; Kanestrom *et al.*, 1998). Dort liegt es zusammen mit dem nukleären Phosphoprotein B23 vorwiegend an dichten fibrillären und granulären Strukturen vor (Miyazaki *et al.*, 1996). Rev kann die Kernporen in beide Richtungen passieren und erfüllt wichtige Aufgaben als Transporter-Protein (Kalland *et al.*, 1994; Meyer & Malim, 1994; Wolff *et al.*, 1995). Seine nukleäre Lokalisation (NLS) wird durch einen basischen Bereich (AS 34-50) vermittelt, der nahe am aminoterminalen Ende des Proteins liegt und 8 Arginin-Aminosäuren enthält (Abb. 3) (Bohnelein *et al.*, 1991; Hammerschmid *et al.*, 1994). In der gleichen Domäne befindet sich der für die Bindung von Rev an das Rev-Responsive Element (RRE) wichtige Bereich RBE (Daly *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1990; Heaphy *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1993). Schließlich ist dieser

Bereich auch für die Multimerisierung von Rev wichtig, wobei der exakte Anlagerungsprozess bislang kontrovers diskutiert wird. Wahrscheinlich lagern sich Rev-Monomere zu Tetrameren (Olsen *et al.*, 1990; Zapp *et al.*, 1991; Malim & Cullen, 1991; Hope *et al.*, 1992), oder höheren multimeren Komplexen (Thomas *et al.*, 1998) zusammen, nachdem initial ein singuläres Rev an RRE gebunden hat. Die für diese Protein:Protein und Protein:RNS Interaktionen wichtigen Bereiche wurden hauptsächlich den AS 14-20 sowie AS 50-56 zugeordnet (Hope *et al.*, 1990). Die Bedeutung des Multimerisierungsprozesses wurde durch Rev-Mutationsanalysen belegt und wird als alles entscheidender Schritt bei der Einleitung des Rev-Protein vermittelten Exports ungespleißter viraler Transkripte diskutiert (Hope *et al.*, 1992; Kjems & Sharp, 1993).

Eine zweite wichtige Domäne ist im karboxyterminalen Bereich von Rev lokalisiert und umfasst ein Leucin reiches Sequenzmotif im Bereich der AS 75-93 (Venkatesh & Chinnadurai, 1990; Zapp *et al.*, 1991; Malim & Cullen, 1991; Weichselbraun *et al.*, 1992). Diese als Effektordomäne bezeichnete Region ist essentiell für die transaktivierende Funktion von Rev. Mutationen in diesem Bereich führten dazu, dass Rev zwar an RRE bindet, jedoch der nukleäre Export der gebundenen Transkripte unterbleibt (Bevec *et al.*, 1992; Malim *et al.*, 1992; Escaich *et al.*, 1995). In RNS-Exportstudien wurde diese Aktivierungsdomäne klar als nukleäres Exportsignal NES identifiziert, welches der gebundenen intronhaltigen mRNA einen alternativen Exportweg eröffnet (Fischer *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1996). Auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern wurden mittlerweile mehrere Proteine identifiziert, die spezifisch an die Aktivierungsdomäne zu binden scheinen. Dies sind der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) (Ruhl *et al.*, 1993), das Protein hRip/Rab (human Rev interacting protein / Rev activating protein), welches sowohl in löslicher Form, als auch assoziiert im nukleären Porenkomplex (NPC) vorkommt (Bogerd *et al.*, 1995; Fritz *et al.*, 1995) und der nukleäre Exportfaktor Exportin1/Crm1. Letzterer scheint ein allgemeiner Exportfaktor zu sein (Stade *et al.*, 1997; Fornerod *et al.*, 1997b) und fungiert z.B. für den nukleären Export zellulärer Proteine wie Proteinkinase Inhibitor α (Fridell *et al.*, 1996).

Unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen wurde gezeigt, dass es noch andere Einflüsse von Rev auf ungespleißte virale mRNA geben kann. So wurde beobachtet, dass der Rev/RRE Mechanismus die Expression eines Reportergens weit mehr steigert, als Rev die Verteilung ungespleißter mRNA im Zellkern und Zytoplasma beeinflusst. Daher wird angenommen, dass Rev die Translationseffizienz positiv beeinflussen kann (Arrigo & Chen, 1991; D'Agostino *et al.*, 1992). Ferner wurde nachgewiesen, dass die Expression von Rev einen stark stabilisierenden Einfluss auf mRNA im Zellkern hat, die eine RRE-Sequenz enthält. Hierbei

wurde deren Halbwertszeit von wenigen Minuten auf mehrere Stunden angehoben (Felber *et al.*, 1989; Malim & Cullen, 1993).

A.5.2. Bindung von Rev an die RNS-Schleifenstruktur RRE

Das Rev-Responsive Element (RRE) wird gebildet durch einen ca. 200 Basen umfassenden Nukleinsäurebereich, der im Env-Gen von HIV-1 lokalisiert ist (Solomin *et al.*, 1990). Dieser minimale Sequenzabschnitt bildet in Transkripten eine komplexe RNS-Sekundärstruktur aus und ist das Ziel der spezifischen hochaffinen Bindung des Rev-Transporterproteins von HIV-1. Die RRE-Sekundärstruktur ist in Abb. 4 dargestellt. Sie weist neben einem Hauptstamm (Stem I) insgesamt vier Stammschleifenstrukturen auf, die mit Stemloop II-V bezeichnet werden.

Die für die Bindung von Rev-Protein bedeutende Region befindet sich im Stemloop II und wird durch eine Reihe nicht gepaarter Nukleotide gebildet, die in dem ansonsten doppelsträngigen Bereich eine kleine Blase ausbilden (Malim *et al.*, 1990). Diese Blase und weitere insgesamt 66 an der Rev-Bindung beteiligte Basen werden Rev-bindendes Element genannt (RBE). Zur genaueren Lokalisierung der Rev-Proteinbindung wurde Stemloop II weiter unterteilt in Stem IIA, Stemloop IIB, Stemloop IIC und Stem IID. Eine ungewöhnliche Homopurin-Basenpaarung zwischen zwei Guanosinbasen im Bereich der Blase zwischen Stem IIA und Stemloop IIB stabilisiert diese Struktur und ist essentiell für die Bindung von Rev-Protein *in vitro* und dessen Funktion *in vivo* (Bartel *et al.*, 1991). Insgesamt 71 Nukleotide dieser Region (pos. 7838-7908 in HIV-HX10) sind für die korrekten Faltung einer funktionellen Rev-Protein-Bindedomäne notwendig (Heaphy *et al.*, 1991). Die Bindung eines singulären Rev-Moleküles führt zu konformellen Veränderungen am Stem IID und ermöglicht so die Bindung eines zweiten Rev-Moleküls. Weitere Rev-Moleküle werden über Protein:Protein und Protein:RNS Wechselwirkungen gebunden. Erst dieser Oligomerisierungsprozess leitet die unter Abschnitt 5.1 beschriebene Rev-Funktion ein (Malim *et al.*, 1990; Pomerantz *et al.*, 1992). Verschiedene Deletionsstudien im RBE, sowie die Verwendung von RNS-Aptameren, kurze 10-18 Basen lange synthetisierte RNS- Zufalls-Oligonukleotide, konnten bei der Untersuchung des Rev/RRE-Mechanismus die Bedeutung der Homopurinbasenpaarung für die Bindung von Rev-Protein belegen (Giver *et al.*, 1993a).

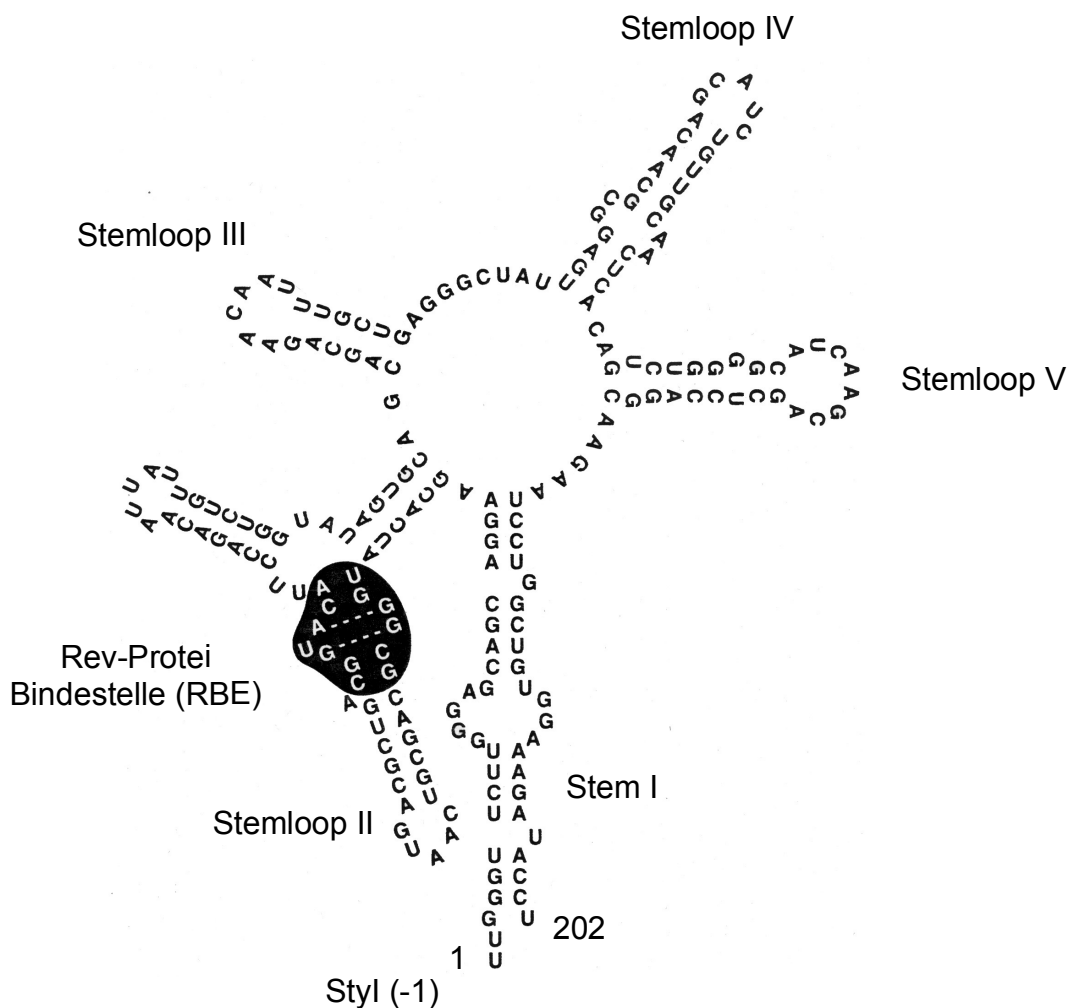


Abb. 4 Rev-Responsive-Element (RRE) Sekundärstruktur. Die nur 202 Basen umfassende minimal erforderliche RNS-Schleifenstruktur genügt um den durch das Rev-Protein vermittelten mRNA-Export zu ermöglichen. Lokalisation in HIV-HX10 = Pos. 7815-8016. Die Schnittstelle Styl liegt unmittelbar oberhalb der RRE-Schleifenstruktur (Verändert nach Solomin et al, 1990).

Gleichzeitig wurde aber gezeigt, dass mit verschiedenen Aptameren bis zu zehnmal höhere Bindungsaffinitäten zu Rev-Protein erreicht werden konnten als dies *in vivo* der Fall ist (Giver *et al.*, 1993b). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der empfindlichen Regulation des mRNA-Exportes durch Rev für die HIV-Genexpression *in vivo*.

In Analogie zum Rev/RRE-Mechanismus erfüllt der Rex/RxRE-Mechanismus bei den onkoviralen Vertretern HTLV-1 und 2 die Aufgabe des Exportes später viraler Transkripte (Hanly *et al.*, 1989). In dem Mason Pfizer Affenvirus MPMV, dem Rous Sarcoma Virus oder auch dem Affenretrovirus Typ 1 (SRV-1), die zu den einfacheren Typ-D-Retroviren gehören (Gardner *et al.*, 1994; Ogert *et al.*, 1996), wird diese Aufgabe jedoch anders gelöst. Hier wurden sogenannte konstitutive Transportelemente CTE identifiziert, die im Gegensatz zu RRE nicht das

viruseigene Rev-Protein, sondern zelluläre Faktoren für den Export gebundener mRNA rekrutieren (Pang *et al.*, ; Saavedra *et al.*, 1997). Die ca. 200 Basen lange CTE-Sequenz liegt in der Nähe des 3'-LTR von MPMV. CTE kann anstelle von RRE in HIV-1-Transkripten unabhängig von Rev-Protein den Export der normalerweise durch Rev regulierten mRNA ersetzen (Bray *et al.*, 1994; Rizvi *et al.*, 1996b; Ernst *et al.*, 1997). Ebenso kann die Funktion von CTE durch RRE in *cis* und Rev in *trans* ersetzt werden (Rizvi *et al.*, 1996a). Die Verwendung von CTE-Sequenzen führt zu einer ähnlich gesteigerten Genexpression von ungespleißten Transkripten (Indraccolo *et al.*, 1998), und kann bei Vorlage mehrerer nacheinander folgender CTE-Motive sogar noch erhöht werden (Wodrich *et al.*, 2000). Der CTE-vermittelte Export scheint jedoch vom Rev-vermittelten Exportweg abzuweichen. Peptide aus dem Bereich des Rev-NES, injiziert in *Xenopus*-Oozyten, beeinflussten den mRNA-Export von CTE-mRNA nicht. Und auch die Präsenz großer Mengen von CTE-mRNA störten nicht den durch Rev regulierten mRNA-Export (Saavedra *et al.*, 1997; Pasquinelli *et al.*, 1997). Leptomycin-B hemmt den Rev/RRE vermittelten mRNA-Export (Wolff *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1998), jedoch nicht den CTE-vermittelten Export (Fornerod *et al.*, 1997a). Eine CTE-Sequenz mit analoger Funktion wurde auch im murinen intracisternalen A-Partikel, einem endogenen Retrovirus der Maus, entdeckt und CTE_{IAP} genannt (Tabernero *et al.*, 1997). Es ist daher wahrscheinlich, dass CTE-ähnliche Elemente einen allgemeinen Mechanismus zur Regulation der viralen Genexpression darstellen (Rizvi *et al.*, 1997).

In einem experimentellen Ansatz zur Bestimmung der Exportrate von ungespleißter HIV-1 tat-mRNA, die normalerweise unabhängig von Rev-Protein exportiert wird, konnte gezeigt werden, dass die Klonierung einer RRE-Sequenz in verschiedene Bereiche eines Tat-Expressionsvektors keinen Einfluss auf einen dann Rev-abhängigen Export von tat-mRNA hatte. Die Funktionalität dieses Exportmechanismus war aber nur gewährleistet, wenn die Orientierung von RRE in "sense" vorlag (Malim *et al.*, 1989). Andererseits war die Funktion der CTE-Sequenz des MPM-Virus in Gag/Pol-Proteinexpressionsstudien nur gewährleistet, wenn sie in der Nähe der Polyadenylierungssequenz lokalisiert war (Rizvi *et al.*, 1996b). Es scheint daher, dass RRE und CTE zwar ähnliche Mechanismen zur Regulation des mRNA-Exportes viraler Transkripte benutzen, CTE aber darüberhinaus z.B. durch Interaktion mit Faktoren, die bei der Polyadenylierung eine Rolle spielen, die mRNA-Stabilität im Zytoplasma erhöhen (Rizvi *et al.*, 1997).

A.6. Mechanismen zur posttranskriptionellen Regulation der HI-viralen Genexpression

A.6.1. RNS-assoziierte Regulationsmechanismen

Für die Regulation der Genexpression bedienen sich Retroviren generell der ribosomalen Leserasterverschiebung und der Methode des alternativen Spleißens der einzigen unter der Kontrolle des LTR-Promoter transkribierten mRNA. Für letzteres werden ausschließlich zelluläre Spleißfaktoren verwendet, und notwendigerweise sind diese Spleißvorgänge relativ ineffizient. Nur so können je nach Bedarf unterschiedliche Teilsequenzen zu neuen Transkripten zusammengeführt und daraus neue Proteine synthetisiert werden (Purcell & Martin, 1993). Das primäre HIV-1 Transkript ist ca. 9 kb lang und beinhaltet fünf 5'-Spleiß-Donorstellen und elf 3'-Spleiß-Akzeptorstellen. Diese werden unter Zuhilfenahme des Spleißapparates der Wirtszelle durch alternative Spleißprozesse unterschiedlich genutzt, um mehr als 30 verschiedene mRNA-Spezies zu erzeugen (Felber *et al.*, 1990; Cullen, 1991; Purcell & Martin, 1993; O'Reilly *et al.*, 1995). Ferner wird ungespleißte mRNA als Virus-Genom-RNS, sowie als Matrize zur Synthese der gag- und pol-Genprodukte benötigt (Guatelli *et al.*, 1990; Pavlakis & Felber, 1990a; Schwartz *et al.*, 1990a). Um einen Ausgleich zwischen der zur Verfügung stehenden gespleißten und ungespleißten mRNA zu erzielen, und gleichzeitig den zeitlichen Verlauf der Produktion dieser verschiedenen mRNA-Spezies zu steuern, bedarf es eines komplexen Regelwerks von Mechanismen, in denen der Funktion von Rev eine zentrale Bedeutung zukommt.

A.6.2. Rev-vermittelter Kernexport

Im Normalfall werden ungespleißte Transkripte im Zellkern zurückgehalten. Sie werden entweder vollständig gespleißt und exportiert oder im Zellkern abgebaut (Chang & Sharp, 1989; Legrain & Rosbash, 1989; Nakielny & Dreyfuss, 1999). Ungespleißte und einfach gespleißte virale mRNA-Moleküle müssen allerdings ebenfalls ins Zytoplasma gelangen. Der Mechanismus der Bindung von Rev an das mRNA-Motiv RRE ist nur einer von mehreren zusammenhängenden Schritten, die schließlich zum erfolgreichen Export dieser mRNA-Spezies führen. Nach der Multimerisierung von Rev am RRE-Motif werden in einem nächsten Schritt zelluläre Crm1/Exportin1-Kernexportproteine, die mit RanGTP assoziiert sind, zu den NES-Motiven der Rev Proteine rekrutiert. Der so entstandenen Rev/RRE/Exportin1/RanGTP Komplex wird zu den Nukleoporen geleitet. Dort erfolgt der Kernexport des Ribonukleoproteinkomplexes, welcher auf der zytoplasmatischen Seite durch die Hydrolyse von RanGTP dissoziiert. Über die Interaktion

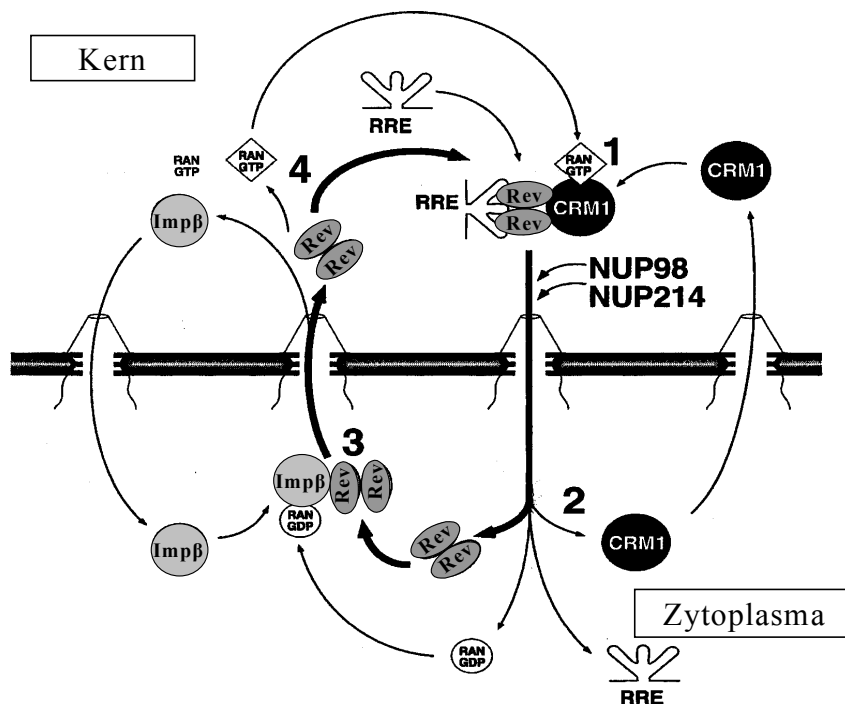


Abb. 5 Zelluläre Interaktionspartner des Rev-Protein vermittelten Exports viraler mRNA und des Rücktransports von Rev in den Zellkern (verändert nach Hope *et al.* 1999).

der Rev-NLS mit dem RanGDP bindenden Importinβ erfolgt der Import von Rev zurück in den Zellkern (Pollard & Malim, 1998; Cullen, 1998).

In letzter Zeit wurden neben CRM1 und RanGTP zusätzliche zelluläre Faktoren identifiziert, die am Rev-vermittelten Export der viralen mRNA beteiligt sind (siehe Abb. 5). So scheint NXT1 durch direkte Wechselwirkung mit CRM1 und RanGTP an den Ribonukleoproteinkomplex zu assoziieren und nach dem Export die effiziente Dissoziation des Komplexes von der zytoplasmatischen Seite der Kernpore einzuleiten (Black *et al.*, 2001). Daneben konnte für eIF-5A sowie die Nukleoporine Nup214, Nup 98 und NLP1 gezeigt werden, dass sie, teils durch direkte Interaktion mit CRM1/Exportin1, am Export viraler Transkripte mitwirken (Bogerd *et al.*, 1998; Zolotukhin & Felber, 1999; Farjot *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2001).

A.6.3. Kernretention viraler mRNA

Der komplexe Regulationsprozess, in dem Rev-Proteine die zentrale Bedeutung einnehmen, ist Teil einer genau regulierten zeitlichen Abfolge von Expressionsschritten, die für eine geordnete

Virusreplikation essentiell ist. Der zweite wesentliche Faktor in diesem Zusammenspiel ist die bereits erwähnte Zurückhaltung von ungespleißter und einfach gespleißter viraler mRNA im Zellkern – gleichzeitig die Voraussetzung für einen Rev-abhängigen Kernexport. Für den Verbleib der mRNA im Zellkern werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht, die Degradation aufgrund instabilisierender Sequenzbereiche und uneffizientes Spleißen an den suboptimalen Spleißstellen (Si *et al.*, 1997).

Eine Anhäufung ungespleißter mRNA im Zellkern findet bei zellulärer mRNA normalerweise nicht statt. Diese mRNA-Moleküle werden rasch und vollständig gespleißt und anschließend exportiert (Izaurralde & Mattaj, 1995; Nakielnny & Dreyfuss, 1997). Wie sich intronhaltige virale mRNA diesem Mechanismus entzieht wurde durch Experimente mit Globin-mRNA untersucht (Chang & Sharp, 1989). Aus der Globin pre-mRNA werden normalerweise durch mehrere Spleißvorgänge insgesamt 3 Exons zur funktionellen mRNA zusammengeführt. Die Verwendung eines artifiziellen, chimären β -Globin Reportersystems mit normalen oder veränderten Spleißstellen zeigte jedoch, dass ineffizientes Spleißen eine notwendige Voraussetzung für die Kernretention und den Rev/RRE vermittelten mRNA-Export ist (Mikaelian *et al.*, 1996). Dabei könnte virale mRNA in HIV-infizierten Zellen – vergleichbar der zellulären pre-mRNA – durch assoziierte Spleißfaktoren im Kern zurückgehalten werden (Lu *et al.*, 1990; Hammariskjold *et al.*, 1994; Stutz & Rosbash, 1994).

Dass Rev-Protein nicht retrovirale Spleißprozesse verhindert, sondern aktiv den Export ungespleißter und einfach gespleißter viraler mRNA unterstützt, konnte erst mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten in *Xenopus*-Oozyten geklärt werden (Fischer *et al.*, 1999). Chimären aus RRE und U3 bzw. U6 snRNA-Molekülen wurden ebenfalls exportiert, obwohl diese snRNA normalerweise den Zellkern nicht verlassen und deren Retention im Zellkern nicht auf eine Interaktion mit Spleißfaktoren zurückgeführt werden kann (Terns *et al.*, 1995).

Auf der anderen Seite sind Elemente im mRNA-Strang beschrieben, die allgemein als *cis*-aktive repressive Sequenzen (CRS) (Rosen *et al.*, 1988) oder inhibitorische Sequenzen (INS) bezeichnet werden. Sie sind verantwortlich dafür, dass in transfizierten oder HIV-1 infizierten Zellen eine genügend große Menge ungespleißter mRNA im Zellkern zurückgehalten wird, die dem Rev-Protein als Substrat dienen (Malim *et al.*, 1989; Felber *et al.*, 1989). CRS-Elemente weisen einen auffallend hohen Gehalt an AU-Sequenzen auf, der über 60 % liegt und sehr untypisch für eukaryotische Gene ist. Lediglich Gene, die für Transkriptionsfaktoren oder Regulatorproteine des Zellzyklus kodieren und daher einer raschen Kontrolle unterliegen,

besitzen ähnlich hohe AU-Sequenzabschnitte, deren Funktion im raschen Abbau entsprechender Transkripte liegt. Transkripte der frühen Gene einer HIV-Infektion enthalten demgegenüber keine CRS-Elemente. Durch Spleißvorgänge werden diese Bereiche aus der pre-mRNS entfernt und die mRNS wird nur als vollständig prozessiertes Molekül exportiert. Die Bedeutung dieser Elemente bei der Regulation des mRNS-Exportes durch den Rev/RRE-Mechanismus wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. So resultierte die Klonierung von Gag-Sequenzabschnitten in ein CAT-RRE-Reportersystem in einer reduzierten Reporteraktivität (Rosen *et al.*, 1988; Cochrane *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992b), die durch Kotransfektion von Rev wieder gesteigert werden konnte. Die Fusion von Gag-Sequenzen an das CAT-RRE Konstrukt erzeugte also eine Rev-Abhängigkeit der CAT-Expression. Die Repression der CAT Aktivität konnte aber ebenfalls durch stille Mutationen AU-reicher Sequenzbereiche innerhalb der Gag-Sequenz teilweise wieder aufgehoben werden (Schwartz *et al.*, 1992a; Schneider *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurden in Gag-Expressionsversuchen mit Konstrukten ohne jegliche HIV-Spleißstellen nach zahlreichen konservativen Mutationen der postulierten INS-haltigen Sequenzabschnitte stark erhöhte Expressionswerte erreicht.

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass erst das Zusammenspiel der Funktion von sub-optimalen Spleißstellen und INS-Bereichen eine zeitliche Regulation des mRNS-Exports und der Expression von HIV-1 Transkripten ermöglicht.

A.7. Zielsetzung

Das gruppenspezifische Antigen (Gag) von HIV-1 ist ein wesentlicher Bestandteil des Virus und weist einen hohen Konservierungsgrad auf. Da vor allem die hohe Variabilität im HIV-Genom die Ursache für das Scheitern der körpereigenen Immunabwehr ist, gilt den Gag-Proteinen besondere Aufmerksamkeit, weil sie einige für die Funktion des Virus lebenswichtige konservierte Regionen enthalten. Bei der Entwicklung wirksamer Präventionsmaßnahmen sowie Therapieansätze gegen HIV-Infektionen spielt das Verständnis molekularer Mechanismen bei der Virusvermehrung eine entscheidende Rolle. Der zeitliche Verlauf der Synthese verschiedener HIV-Proteine wird entscheidend durch das viruseigene Rev-Protein reguliert. Daher ist die Aufklärung des Zusammenspiels von zelleigenen und viralen Faktoren beim Export viraler Transkripte von großer Bedeutung und wird in den letzten Jahren intensiv erforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchung der Regulation der Gag-Synthese durch cis-aktive Bereiche im HIV-Genom, sowie die Expression von HIV-1 *gag*, unabhängig von

viruseigenen regulatorischen Mechanismen. Der mRNA Export von *gag*-Transkripten aus dem Zellkern und deren Translation sollte mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Systems untersucht werden. Es sollten inhibitorische Sequenzen (INS) in der für das *gag*-Gen kodierenden Sequenz, sowie mehrere nicht translatierte Regionen (NTR) stromaufwärts von *gag* und in der Umgebung des RRE auf eine mögliche Funktionalität für den mRNA-Export überprüft werden. Regulatorische Effekte, bedingt durch die Präsenz HIV-1-*gag* relevanter Nukleinsäuresequenzen würden im Luciferase-Assay den Export der Fusions-RNS-Konstrukte oder deren Translation beeinflussen und so zu einer veränderten Luciferase-Reporteraktivität führen.

Ausserdem war die Bedeutung verschiedener nicht kodierender Sequenzregionen des HI-Virusgenoms für die Expression von Gag von großem Interesse. Die Sequenzumgebung und Länge des Rev-Responsive-Elements (RRE), sowie die Funktion von Spleißstellen sollten daher in Zellkulturversuchen untersucht werden. Für diese Fragestellung sollten verschiedene Genabschnitte von *gag* in geeignete Vektoren kloniert und mittels Transfektionsmethoden in Zellkulturen exprimiert werden. Geeignete Nachweisverfahren (z.B. ELISA) würden zur quantitativen Analyse entsprechender Genprodukte dienen.

B. Material und Methoden

B.1. Material

Die für diese Arbeit notwendigen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die verschiedenen eingesetzten Enzyme stammen von Boehringer (Mannheim) beziehungsweise Biolabs (USA).

B.1.1. Puffer

Die Zusammensetzung aller nicht eigens erwähnten Pufferlösungen sind den Labor-Standardwerken Maniatis (Molecular Cloning Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, New York) und Current Protocols of Molecular Biology (Wiley & Sons Inc., New York) zu entnehmen. Die am häufigsten benötigten Puffer werden hier nur in ihrer molaren Zusammensetzung beschrieben.

B.1.1.1.1. PBS für den Proteinnachweis im Western-Blot und für die Zellkultur (steril):

0,14 M NaCl, 2,7 M KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4

TPBS zum Waschen der Filtermembranen nach der Inkubation mit Antikörpern:

PBS + 0,1 % Tween 20, für ECL auch 0,3 % Tween 20

B.1.1.1.2. Tris/EDTA-Puffer zum Lösen von präparativ hergestellter DNS:

10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 7,5 und pH 8,0; auch als 10x Puffer

B.1.1.1.3. Tris-Borat/EDTA-Puffer für die DNS-Gelelektrophorese (10x):

0,45 M Tris Base, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0

B.1.1.1.4. DNS-Probenpuffer (10x):

40 % w/v Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, gelöst in 10x TBE

B.1.2. Bakterien

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungsarbeiten kamen die *Escherichia coli* (*E. Coli*) K12 Sicherheitstämme *DH5α*, *JM109* und *GM169* zur Anwendung.

DH5α weist als wichtigstes Merkmal eine Deletion im 5'-Bereich des chromosomalen *lacZ*-Gens auf. Durch Komplementation mit dem pUC-kodierten *lacZ*-α -Peptid erhält die verkürzte β-Galaktosidase ihre Aktivität zurück. Darüber hinaus weist der Stamm einen *recA1*-Genotyp aus, so dass er über eine verringerte Rekombinationshäufigkeit verfügt. *JM109* wurde alternativ zu *DH5α* eingesetzt, wenn Transformationen in *DH5α* nicht zum gewünschten Erfolg führten. Der Bakterienstamm *GM169* unterscheidet sich von *DH5α* im wesentlichen durch eine Defizienz in der *dam*- und *dcm*-Methylierung. Um *dam*- bzw. *dcm*-sensitive Restriktionsendonukleasen, wie z.B. *ClaI*, *BclI* oder *XbaI* nutzen zu können, wurden im Einzelfall die entsprechenden Plasmide entweder direkt in *GM169* kloniert oder in diesen Stamm umtransformiert. Da *GM169* nicht Endonuklease negativ ist war die Qualität der präparierten DNA nicht mit der aus *DH5α* vergleichbar. DNA präpariert aus *GM169* war deshalb für Transfektionsexperimente oder zur längerfristigen Lagerung nicht geeignet. Die kodierenden Leserahmen aller später in eukaryotischen Expressionssystemen exprimierten Fremdproteine, sowie die für Untersuchung regulatorischer Vorgänge auf transkriptioneller Ebene verwendeten Sequenzen wurden zunächst in *E.coli* kloniert, auf DNS-Ebene charakterisiert und in funktionell wichtigen Bereichen sequenziert.

DH5α *supE44ΔlacU169* (Φ80*lacZΔM15*), *hsd R1*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan & Meselson, 1983)

GM169 *mutS453*, *dam-3*, *thr-1*, *ara-14*, *leuB6*, *del (gpt-proA) 62*, *lacY1*, *tsx-33*, *supE44*, *galK2*, *hisG4*, *metB1*, *rfbD1*, *mgl-51*, *rpsL260*, *kdgK51*, *mtl-1*, *thi-1*, *deoB16*

JM109 *F' traD36*, *lacIq (lacZ)M15*, *proA+B+/e14-(McrA-)* (*lac-proAB*) *thi*, *gyrA96* (*Nalr*) *endA1*, *recA1*, *hsdR17(rk-mk+)*, *relA1*, *supE44* (Yanisch-Peron, C. *et al.*, Gene 1985)

B.1.3. Nukleinsäuren

B.1.3.1. HIV-1 Wildtyp Stamm

Das verwendete Provirus-Konstrukt HIV-1_{HX10} (Ratner et al, 1985) ist aus den LTR-Sequenzen des Stammes HIV-1_{HXB2} (Pos. 1-830, und 8897-9718) und dem Hauptteil des HIV-Genoms aus dem promoterlosen Virus-Konstrukt HIV-1_{BH10} (Pos. 154-8252) zusammengesetzt. Nach der reversen Transkription in DNS wurde diese Sequenz in den Polylinkerbereich des Vektors pSP 65 zwischen die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* kloniert. Grundsätzlich wurde in

dieser Arbeit bei der Numerierung nicht mit der ersten Base des ca. 9600 Basen langen Vorläufertranskriptes begonnen (Position 454 = Transkriptionsstart im *tar*-Element), sondern mit der ersten Nukleinsäure der HIV-Sequenz (Position 1).

B.1.3.2. Reporterplasmide

pCMV-GFP Das grün fluoreszierende Protein, isoliert aus *Aequorea victoria*, wird aufgrund der konservativen Übersetzung des GFP-Gens unter Verwendung der humanen Kodonnutzung (Fukumura *et al.*, 1998) sehr effizient exprimiert. Als Reporter in Zellkulturexperimenten kotransfiziert, eignet es sich sehr gut zur Überprüfung der Transfektionsrate. Dies kann direkt durch Betrachtung im Mikroskop oder durch FACS SCAN im UV-Licht erfolgen (Vogel *et al.*, 1998).

pCMV-SEAP Eine thermostabile Form der sezernierten alkalischen Phosphatase wird von mit pCMV-Seap (Promega, USA) transfizierten Zellen in das Kulturmedium freigesetzt. Die Ermittlung der AP-Aktivität kann bereits aus einem Mediumvolumen von 20 µl erfolgen.

pRep-SEAP Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des RSV-Promoters im Vektor pRep8 wurde das Reportergen SEAP über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* aus dem Plasmid pCMV-SEAP ausgeschnitten und in die MCS des Vektors pRep8 ligiert.

pBK_{RSV}-SEAP In gleicher Weise wurde das Reportergen auch in den Expressionsvektor pbkRSV (Stratagene) kloniert, der sich sowohl für bakterielle als auch für eukaryotische Expression eignet.

pGL3-control Das pGL3-control-Plasmid ist ein Expressionsplasmid für Photinus-Luziferase mit SV40-Promoter. Eine singuläre *XbaI* Restriktionsschnittstelle unmittelbar nach dem Stopkodon des Luziferase Gens ermöglichte die Klonierung von HIV-1 Gensequenzen und die Untersuchung deren Einflüsse auf die Expression des Luziferase Gens. Als zweiter Bestandteil des Dual Light Luziferase Kits diente das Renilla-Luziferase Expressionsplasmid pRL mit CMV-Promoter zur internen Standardisierung der Photinus-Luziferase Messungen. (Promega, USA)

B.1.3.3. Plasmide zur Expression von Fremdgenen

pRep8 Eukaryotischer EBV abgeleiteter Expressionsvektor. Enthält neben einem Histidinolresistenzgen zur Selektion von positiven Transfektanden den Ori P sowie das EBNA-1 Gen aus EBV für eine stabile episomale Replikation in der

Wirtszelle (Invitrogen). Der RSV-Promoter wird für die Genexpression verwendet.

- pBK_{RSV}** Prokaryotischer und eukaryotischer Expressionsvektor mit RSV-Promoter für die eukaryotische Expression. pbkRSV wurde zur bakteriellen Expression von HIV-1 Gag Gensequenzen verwendet. (Stratagene)
- pcDNA3** Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promoter, der für transiente Expressionsversuche verwendet wurde. Zusätzliche Phagenpromoter-Bindestellen T7 in 5'- und T3 in 3'- Orientierung ermöglichen die *invitro* Transkription klonierter Gene und die Herstellung von RNS-Sonden für die Northern-Blot Analyse (Invitrogen).
- pc-REV** Exprimiert das HIV-1 Rev Gen. Dieses Konstrukt wurde von Anja Bühner (Diplomarbeit, 1996) durch Klonierung der beiden Rev-Exonsequenzen in den Expressionsvektor pcDNA3 hergestellt.

B.1.3.4. Hergestellte Konstrukte für Reporter- und Expressionsstudien

In mehreren aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten wurden aus den oben aufgeführten Plasmiden verschiedene Konstrukte für Luziferase-Reporterstudien und Gag-Expressionsstudien hergestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind alle im Ergebnis teil vorgestellten Konstrukte zusammengefasst und deren Verwendungszweck benannt.

Plasmidname	eingefügte Sequenzen	Verwendungszweck
pGL3-control	-	Ausgangsplasmid für Luziferase-Reporterstudien
pGL-RRE ₂₇₀	kürzester RRE-Bereich (nt 1557-1824)	Ermittlung der für die Interaktion mit Rev-Protein optimale Fragmentlänge des (RRE)
pGL-RRE ₃₃₀	der in der Literatur als optimal beschriebene RRE-Bereich (nt 1496-1824)	
pGL-RRE ₅₂₅	mittlerer RRE-Bereich (nt 1410-1903)	
pGL-RRE ₇₃₂	längerer RRE-Bereich (nt 1410-2130)	
pGL-RRE ₈₅₄	längster RRE-Bereich (nt 1410-2253), RRE-Sequenz enthält eine Spleiß-akzeptorstelle	

Plasmidname	eingefügte Sequenzen	Verwendungszweck
pGL-RRE ₃₃₀ - <i>gag</i>	RRE ₃₃₀ + HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-1539)	Untersuchung der Ortsabhängigkeit von RRE
pGL- <i>gag</i> -RRE ₃₃₀	<i>gag</i> + RRE ₃₃₀	Untersuchung der Ortsabhängigkeit von RRE
pGL-RRE ₃₃₀ - <i>f1</i>	<i>gag</i> -Sequenzfragment 1 (nt 1-545)	Untersuchung isolierter <i>gag</i> -Sequenzbereiche auf ihren Einfluss im Reporterassay
pGL-RRE ₃₃₀ - <i>f2</i>	<i>gag</i> -Sequenzfragment 2 (nt 449-997)	
pGL-RRE ₃₃₀ - <i>f3</i>	<i>gag</i> -Sequenzfragment 3 (nt 937-1539)	
pGL-NTR <i>gag</i> -RRE ₃₃₀	nicht translatierter Bereich stromaufwärts des <i>gag</i> -Startkodons + <i>gag</i> + RRE ₃₃₀	Untersuchung der Bedeutung der Spleißdonorstelle oberhalb des Startkodons von <i>gag</i>
pGL-NTR <i>gag</i> -RRE ₈₅₄	NTR (nt -105-0) + <i>gag</i> + längstes RRE ₈₅₄	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen einer SD-Stelle im NTR und einer SA-Stelle im RRE ₈₅₄

pBK _{RSV}	-	Ausgangsplasmid für die bakterielle Expression von Gag-Proteinsequenzen
pBK- <i>F1</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-555)	p17 und INS-1 abdeckender Bereich
pBK- <i>F2</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 447-1020)	p24 und Teile der INS-2 abdeckender Bereich
pBK- <i>F3</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 923-1539)	p15 und Teile der INS-2 abdeckender Bereich
pBK- <i>gag</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-1539)	gesamte Sequenz von <i>gag</i>

pRep8	-	Ausgangsplasmid für Gag-Expressionsstudien in B-Zellen
pRep- <i>f1</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-555)	p17 und INS-1 abdeckender Bereich
pRep- <i>f2</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 447-1020)	p24 und Teile der INS-2 abdeckender Bereich
pRep- <i>f3</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 923-1539)	p15 und Teile der INS-2 abdeckender Bereich
pRep- <i>gag</i>	HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-1539)	gesamte Sequenz von <i>gag</i>

Plasmidname	eingefügte Sequenzen	Verwendungszweck
pcDNA3	-	Ausgangsplasmid für transiente Gag-Expressionsstudien in Cos7-Zellen
pc-gag	HIV-1 <i>gag</i> (nt 1-1539)	Gag-Expressionsplasmid ohne RRE
pc-gag-RRE ₃₃₀	zusätzlich RRE (nt 1496-1824)	mit kurzem RRE
pc-gag-RRE ₈₅₄	alternativ RRE (nt 1410-2253)	mit langem RRE und SA-Stelle
pc-gag-RRE ₈₅₄		falsche Orientierung von SD und SA
pc-NTRgag-RRE ₈₅₄	zusätzlich NTR (nt -105-0)	richtige Orientierung von SD und SA
pc-NTRgag-RRE ₈₅₄		Deletion von SD und SA

Tab. 1 Tabellarische Darstellung der hergestellten Luziferase-Reporterplasmide und HIV-1 Gag-Expressionsplasmide. *f1*, *f2*, *f3*=*gag*-Fragment 1 bis 3, NTR=nicht translaterter Bereich, nt=Nukleotidposition im HIV-1 HX10 Genom (9751 Basen), INS=inhibitorische Sequenz, RRE="Rev-Responsive-Element". Die einzelnen Schritte zur Herstellung dieser Konstrukte sind im Ergebnisteil jeweils exemplarisch für ein Plasmid dargestellt. Position von *gag* im Stamm HIV-1HX10: nt 789-nt 2327, *env* nt 6257-8827. Zur Orientierung im HX10 Genom: die Position des RRE-Motives erstreckt sich relativ zur Gesamtsequenz von nt 7801-8034. Innerhalb des *env*-Gens reicht sie von nt 1545-1778. Die Durchnumerieren der *gag*- und *env*-Sequenzbereiche beginnen der Übersichtlichkeit halber jeweils mit der Zahl 1 ab dem jeweiligen Startkodon. Die Numerierung des NTR bezieht sich auf das Startkodon von *gag*.

B.1.3.5. Oligonukleotide

Die nachfolgend in Tabelle 2 aufgeführten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des institutseigenen Synthesegerätes (Millipore, Eschborn) durch Holger Melzl hergestellt.

B.1.3.5.1. Für die Subklonierung viraler DNS:

Name	5' Nukleinsäuresequenz 3'	Basen
2.1.2	agaagGCTAGC GATG CCTGCGAGAGC NheI	26
2.2	agcCTCGAGTT TTAATCTTGTGGG XhoI	24
2.3	atatcaGCTAGC ATGTTAAATGCATG NheI	26
2.4	gctggtCTCGAGGCT TATAAAATAG XhoI	25
2.5	gcttcacaggaGCTAGCAAATTGG NheI	24
2.6	ctaCTCGAGCTTCCTTTAGTTGC XhoI	23
Gag4-1f	tgcGAATTC GATG CCTGCGAGAGCGTCAG EcoRI	29
Gag4-6r	cgGAATTCGCGCGCTTTATTGTGACGAGGGGTC EcoRI BssHII	33

Name	5' Nukleinsäuresequenz 3'	Basen
Gag5-1f	cgGAATTTCGCGC <u>CGCATG</u> GCCTGCGAGAGCGTCAG <i>EcoRI BssHII</i>	34
Gag5-6r	cgGAATTCTCGAGTTTATTGTGACGAGGGGTC <i>EcoRI XhoI</i>	32
Gag5's.j.-6-1f	cgGAATTTCGCGCGC <u>CGACGCAGGACTCGGCTTG</u> <i>EcoRI BssHII</i> pos. 684 in HIV	33
F1-3-2r	cgGAATTTCGCGCGCTTTAATCTTGTGGGGTGGCTC <i>EcoRI BssHII</i>	36
F1-4-2r	cgGAATTCTCGAGTAAATCTTGTGGGGTGGCTC <i>EcoRI XhoI</i>	33
F2-3-3f	cgGAATTCA <u>GCCATG</u> GTAAATGCATGGGTAAAAGTAG <i>EcoRI</i>	37
F2-4-3f	cgGAATTTCGCGCGC <u>GCATGGGTAAAAGTAGTAGAAG</u> <i>EcoRI BssHII</i>	36
F2-3-4r	cgGAATTTCGCGCGCTCTTATAGTGTAGCCGCTGGTC <i>EcoRI BssHII</i>	36
F2-4-4r	cgGAATTCTCGAGTTCTTCTAGTGTAGCCGCTG <i>EcoRI XhoI</i>	33
F3-4-5f	cgGAATTCA <u>GACATG</u> GAGCAAGCTTCACAGGAGG <i>EcoRI</i>	34
F3-5-5f	cgGAATTTCGCGCGC <u>GAGCAAGCTTCACAGGAGG</u> <i>EcoRI BssHII</i>	33
RRE330afc	cgtacTCTAGAGAATTCCAAGGCAAAGAGAAGAGTG <i>XbaI EcoRI</i>	36
RRE330arc	gctcgTCTAGAGCGCGCACAGCAGTGGTGCAAATG <i>XbaI BssHII</i>	35
RRE330bfc	gtacgTCTAGAGCGCGCCAAGGCAAAGAGAAGAGTG <i>XbaI BssHII</i>	36
RRE270/330brc	cgtacTCTAGAGAATTACAGCAGTGGTGCAAATG <i>XbaI EcoRI</i>	35
RRE270fc	gtacgTCTAGAGCGCGCCTTGGGTCTTGGGAGCAG <i>XbaI BssHII</i>	36
RRE505/732/854fc	atccgCTCGAGGCGCGCTTCAGACTTGGAGGAGGAG <i>XhoI BssHII</i>	36
RRE854rc	acttgGCGCGCGAATTCCGTTCACTAATCGAATGGATC <i>BssHII EcoRI</i>	38
RRE732rc	gattgGCGCGCGAATTCTGCCTAACTCTATTCACTATAG <i>BssHII EcoRI</i>	39
RRE505rc	cattgGCGCGCGAATTCCTTCTCTGTCCCACTCCATC <i>BssHII EcoRI</i>	37
RRE330expr.fc	gaAGATCTGCGCGCCAAGGCAAAGAGAAGAGTG <i>BglII BssHII</i>	33
RRE330expr.rc	cgGGATCCCCGCGCGCACAGCAGTGGTGCAAATG <i>BamHI BssHII</i>	33
RRE854expr.fc	gaAGATCTGCGCGCTTCAGACTTGGAGGAGGAG <i>BglII BssHII</i>	33
RRE854expr.rc	cgGGATCCCCGCGCGCCGTTCACTAATCGAATGGATC <i>BamHI BssHII</i>	36

B.1.3.5.2. Für die Einführung sequenzspezifischer Mutationen:

NTR-SDmut-f	GGCGGCGACTGGTGACCCACGCCAAAAATTTTACTAGCG	39
-------------	---	----

NTR-SDmut-r	CGCTAGTCAAAATTTTTGGCGTGGTCACCAGTCGCCGCC	39
RRE-SAmut-f	CACCATTATCGTTTCCACCCACCTCCCAATC	32
RRE-SAmut-r	GATTGGGAGGTGGGTGGGAAACGATAATGGTG	32

B.1.3.5.3. Für die In Vitro Transkription mit T7/T3 Phagenpromoter

T7-invitrotransc.-luz-f	CCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG transc. start \	52
T3-invitrotransc.-luz-r	CCGAAGCTAATTAACCCTCACTAAAGGGTTACACGGCGATCTTTCCGCC	49
luz-f	GACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC	25

B.1.3.5.4. Für die Sequenzierung klonierter Fragmente:

Sequenzierprimer im Expressionsvektor pRep8		
S1f	CCATTACCCACATTGGTGTGCACC	24
S2r	CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC	24
Sequenzierprimer in HIV-1 Gag		
b-r	GTTCTTCTGATCCTGTC	17
C2-f	GGGCAAATGGTACATCAGGCCC	22
c3-r	TGGCCTGATGTACCATTGCCC	22
D3-f	GAGAGAACCAAGGGGAAGTGAC	22
d3-r	GTCATTCCCCTTGGTTCTCTC	22
E2-f	GGCCCCTAGGAAAAGGGCTGTTGG	25
e3-r	CTGTTGGCTCTGGTCTGCTCTG	22
Sequenzierprimer in HIV-1 Env im Bereich des RRE		
RRE1fs	GAGCAGTGGGAATAGGAG	18
RRE2fs	CTGGAATCACACGACCTGG	19
RRE-rs	CTCCTATTCCCCTGCTC	18
Sequenzierprimer im Reporterplasmid pGL3control		
pGL3fs	AAACTCGACGCAAGAAAAATCAG	23
pGL3rs	CCAAACTCATCAATGTATCTTATC	24
Sequenzierprimer für Phagenpromoterbindestellen		
SP6-rs	CTAGCATTTAGGTGACACTATAG	23
T7-fs	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	23

Tab. 2 Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen: f = forward; r = reverse, s = sequencing, c = cloning, SD = Spleiß-Donor, SA = Spleiß-Akzeptor; Sequenz kleingeschrieben = Anhang für effizienteres Schneiden der Restriktionsenzyme; unterstrichen = eingeführte Restriktionsenzym-Schnittstellen; grün = Teil der Originalsequenz, blau = Kozak Sequenz, gelb = Phagenpromotersequenz, rot = Punktmutation.

Sequenzierprimer in HIV-1 gag, sowie im Expressionsplasmid pRep8

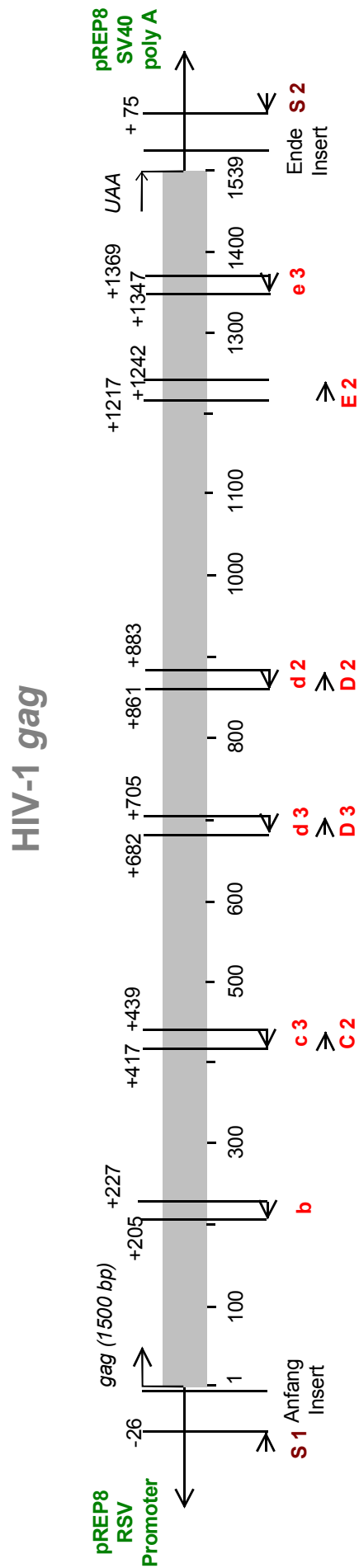


Abb. 6 Position der Sequenzierprimer in HIV-1-gag. "kleine Buchstaben" bezeichnen Primer, die für die Sequenzierung in 5'-Richtung des S-Instranges verwendet wurden, "GROSSSE Buchstaben" stehen für Primer in 3'-Richtung des S-Instranges.

B.1.4. Nährmedien

B.1.4.1.1. Nährmedien für Bakterien:

Die Anzucht von *E.coli* Bakterienkulturen erfolgte in Luria Bertani (LB)-Medium (5 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton (Difco, Hamburg), 5 g Hefeextrakt (Difco), pH 7,3 einstellen und mit H₂O bid. auf 1000 ml auffüllen). Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % Agar (Difco) zugefügt. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch Zusatz der Antibiotika Ampicillin (50-100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml).

B.1.4.1.2. Nährmedien für eukaryotische Zellen:

Zur Kultivierung eukaryotischer Zelllinien wurden die in der Tabelle 3 zusammengefassten, vorgefertigten Nährmedien verwendet. Nährmedien, Antibiotika und fötales Kälberserum wurden von den Firmen Gibco, Life Technology (Eggenstein) oder PAN (Aidenbach) bezogen.

Zelllinie	Basalmedium	Zusätze
B-Zelllinien	RPMI 1640	10 % FKS, Kana (100 µg/ml) oder Genta (µg/ml)
Cos7	DMEM mit Pyridoxinphosphat	10 % FKS, Kana (100 µg/ml)
CEM	RPMI 1640	10 % FKS, Pen (100 IE/ml) /Strep (100 µg/ml)
H1299	DMEM mit Pyridoxinphosphat	10 % FKS, Kana (100 µg/ml)
Hela	DMEM mit Pyridoxinphosphat	10 % FKS, Kana (100 µg/ml)

Tab. 3 Verwendeten Nährmedien und die Resistenzzusätze (nach Produktbeschreibung Gibco, Life Technology (Eggenstein)).

Die Zellkulturen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei einem Kohlendioxidgehalt von 6 % und einer Temperatur von 37°C gehalten. Die Kapazität des Bicarbonat Puffersystems wurde durch den Zusatz von Phenolrot kontrolliert.

B.1.5. Eukaryotische Zelllinien

B-Zelllinien: aus HIV-1 infiziertem Spenderblut, gewonnen durch Superinfektion mit EBV. Langzeitkulturen übernommen von Dr. S. Haist.

CEM: humane T-Helfer-Lymphom-Zelllinie (Foley G. E. *et al.*, 1965).

- Cos7: adherent wachsende, fibroblastenähnliche Affennieren-Epithelzelllinie, infiziert mit dem large T-Antigen des SV40 Virus (ATCC CRL 1651).
- HeLa: adherent wachsende Zervixkarzinomzelllinie, HeLa-Magic (HeLa-M) zusätzlich mit einer stillen Kopie des β -Gal Gens und dem HIV-1 Promoter "*tar*" (ATCC).
- H1299: adhären wachsende Lungenkarzinom-Zelllinie, p53 negativ, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Michael Nevels (Mitsudomi *et al.*, 1992)

B.1.6. Virusstämme

Ein Virusstock des HIV-1 LAI Laborisolates sowie Zellen und Zellaufschlüsse infizierter T₄-Helfer-Zellen MT4 als HIV-1 Positivkontrolle für Western-Blots, Immunfluoreszenz und zur Isolierung von RNS für Northern-Blot Analysen wurden von Herrn Dr. Bernhard Kattenbeck zur Verfügung gestellt.

B.1.7. Antikörper und Antiseren

Für den Nachweis des HIV-1 p55 Vorläuferproteins im Western-Blot und im ELISA wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Ralf Wagner aus unserer Abteilung zwei murine mAk überlassen. Der mAk 16 / 4 / 2 sowie der mAK 13 / 5 erkennen beide Regionen in der Nähe des Übergangs zwischen p17 und p24 Antikörper (Wolf *et al.*, 1990). Der mAK 13 / 5 war dabei deutlich spezifischer als mAK 16 / 4 / 2. Seren HIV-1 infizierter Patienten wurden von Herrn Dr. Yiming Shao, Peking bereitgestellt. Ein muriner mAK gegen das HIV-1 p17 Antigen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mathias Niedrig (Robert Koch Institut, Berlin) bereitgestellt.

Zwei HIV-1 Rev spezifische mAk (8001 und 8101) wurden von der Firma Intracel (London, GB) bezogen. Alle nicht gesondert aufgeführten Sekundärantikörper, gegen murine- oder humane Epitope primärer mAK gerichtet, wurden von der Firma Bio-Rad (München) geliefert.

B.1.8. Computerprogramme und Datenbanken

Die Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Word (Office 97, Microsoft) auf einem Pentium Personal Computer (PC) mit Win95 als Betriebssystem verfasst. Alle Zeichnungen und Diagramme wurden mit den Programmen Micrografx Designer 7, Excel (Office 97, Microsoft) und SigmaPlot, Version 4.0 (Jandel Scientific) angefertigt. Berechnungen zur Ermittlung der linearen Regression wurden ebenfalls mit den Programmen Sigma Plot und Excel durchgeführt.

Die DNS-Sequenz des HIV-1 Isolates HXB2c (accession # K03455, M38432, Ratner *et al.*

1987) wurden der GCG Datenbank entnommen. Mit dem Softwarepaket GCG, Version 8 und 9 (Genetics Computer Group, Madison, USA) wurden an einem Indy Graphics Server Restriktionsendonuklease-Schnittstellen als Grundlage für Klonierungsarbeiten, sowie offene Leserahmen und die entsprechenden Aminosäuresequenzen bestimmt. Sequenzüberprüfungen klonierter Gene wurden mit dem Programm SeqEd®, Version 1.0.3 (Applied Biosystems) an einem Apple Power-Macintosh Computer durchgeführt. Die Schmelzpunkte und Konzentrationen der verwendeten Oligonukleotide sowie deren Qualität bezüglich der Bildung von Dimeren oder internen Konsensus-Sequenzen wurden mit dem Programm Gene Runner 3.0 (Hastings Software, Inc., USA) untersucht. Das graphische Design der hergestellten Plasmide sowie die Erstellung der Klonierungs-Schemata erfolgte mit dem Programm VNTI 4.03 (Informax, North Bethesda, USA). Zur Auswertung der gewonnenen Daten bei der FACS-Scan Analyse wurde das Programm WinMDI Ver.2.6 verwendet. Für Literatursuchen wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) mit dem Suchprogramm WinSpirs™ (Silverplatter International) benutzt. Aus Aktualitätsgründen wurde vorwiegend die Medline Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed> im Internet durchsucht. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm Reference Manager 9.5 für Win 98 erstellt (Research Information Systems, USA).

B.2. Methoden

B.2.1. Klonierungen in *E.Coli*

B.2.1.1. Herstellung und Reinigung von Oligonukleotiden

Alle Oligonukleotide wurden nach dem Prinzip der Festphasensynthese mit einem Gerät der Firma Millipore (Eschborn) hergestellt. Die Abspaltung der Oligonukleotide von der Säulenmatrix erfolgte durch Inkubation der Matrix bei 56°C in 32 %-iger Ammoniaklösung. Die Matrix wurde hierzu aus der Säule entnommen und in ein fest verschließbares 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Während einer 4 stündigen Inkubation erfolgte sowohl die Ablösung der Nukleinsäuren vom Trägermaterial als auch die Abspaltung der Schutzgruppen in ein und demselben Gefäß. Die freien Oligonukleotide wurden durch Gelchromatographie über NAP™ 10-Säulen (Sephadex® G-25) von den abgespaltenen Schutzgruppen und verbliebenem Ammoniak befreit. Die Nukleinsäuren wurden in einem Volumen von 1,0 ml auf die zuvor mit 10 ml H₂O bid. äquilibrierten Säulen aufgetragen und mit 1,5 ml H₂O bidest eluiert. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde spektrophotometrisch vermessen. Dazu wurde die

Absorption der DNS bei OD_{260 nm} ermittelt. Weitere Qualitätsanalysen der Oligonukleotide erfolgten bei Bedarf mittels Visualisierung der DNS auf einem 4 % Nusieve Agarosegel (FMC BioProducts, USA).

B.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In einer Standard PCR-Reaktion wurden DNS-Sequenzen mit einem Thermal-Cycler (9600, Perkin Elmer, oder PTC-200, MJ Research) amplifiziert. Über die gewählten Oligonukleotide wurden flankierende Schnittstellen als Klonierungshilfen erzeugt sowie sequenzspezifische Mutationen eingefügt. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) von überschüssigen Nukleotid-Triphosphaten, Oligonukleotiden, Taq-Polymerase sowie Salzen gereinigt, bevor sie mittels RE geschnitten wurden. Für die Amplifikation von Gensequenzen zur weiteren Klonierung und Subklonierung wurde nicht die Taq-Polymerase, sondern die Pwo-Polymerase (Boehringer, Mannheim) verwendet, da diese im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine 3'-5'-Lesekorrekturfunktion aufweist.

Ein PCR-Standardprotokoll sowie die generellen Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsbedingungen wurden nach folgendem Protokoll verwendet:

5 µl 10 x PCR Puffer, 5 µl 2 mM dNTPs, je 25 pmol 5' Oligonukleotid und 3' Oligonukleotid, 10-20 ng Template-DNS und 0,5 µl Taq-Polymerase 5 U (alle Reagenzien BM, Mannheim), Standardansatz 50 µl mit H₂O bidest. ergänzt.

Zyklen einer 3-stufigen PCR-Reaktion:

Einleitender Denaturierungsschritt 94°C, 2 min; 30 wiederholende Zyklen von Denaturierung bei 94°C, 30 Sek, Annealing bei 55°C 1 min und Elongation bei 72°C, 2 min. Abschließend wurde bei 72°C ein 5 min Polymerisationsschritt durchgeführt und die Reaktion durch Kühlung bei 4°C beendet.

B.2.1.3. Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In der RT-PCR wird zunächst RNS durch die Aktivität der Reversen Transkriptase in DNS übersetzt, und in dem danach folgenden Reaktionsschritt die DNS amplifiziert. Die Isolierung der RNS ist ausführlich im Abschnitt B.2.4.2 unter Northern-Blot Analyse beschrieben. 2-10 µl, ca. 1 µg RNS einer aus 1x10⁷ Zellen gereinigten, und in 50 µl Volumen aufgenommenen RNS-Fraktion wurden für die RT-PCR-Reaktion (Titan™ OneTube RT-PCR, Boehringer Mannheim) eingesetzt. Mastermix 1, 25 µl (je 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 5 mM DTT, 20 U

RNAsin und 1 µg RNA-Template sowie je 0,4 µM 5'- und 3' Primer) und Mastermix 2, 25 µl (5x RT-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ Endkonzentration und 1 µl AMV reverse Transkriptase) wurden vereinigt und zur Reaktion der reversen Transkription 30 min bei 55°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte sofort die PCR, ohne das Gefäß nochmals zu öffnen.

B.2.1.4. Standardmethoden zur Modifikation von DNS

B.2.1.4.1. Spaltung von Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen:

Plasmide sowie gereinigte PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in einem Standardansatz (Sambrook *et al.*, 1989) 1 Std. bei 37°C oder 50°C (*BssHII*) gespalten.

B.2.1.4.2. Dephosphorylierung freier 5'-Enden:

Die verwendeten Vektoren wurden grundsätzlich mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (SAP=shrimps alkaline phosphatase) behandelt. Ca. 20 min vor Ende des Restriktionsverdaus wurde jeweils 1 µl SAP zum Restriktionsverdaus zugegeben. SAP entfernt quantitativ die Phosphate freier 5'-Enden. Auf diese Weise wird eine Selbstligation des Vektors verhindert, was vor allem bei Ligationen von nicht überhängenden Enden (blunt-end) von Bedeutung ist.

B.2.1.4.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten:

DNS-Fragmente wurden gelelektrophoretisch in einem Agarosegel (mit 10 ng/ml Ethidiumbromid) in horizontalen Elektrophoresekammern (Fa. Hölzel, Dorfen) aufgetrennt. Als Puffersystem wurde TBE verwendet. Als Molekulargewichtsmarker dienten je nach den zu erwartenden Fragmentlängen die Boehringer-Standards VI, VII oder Standard X. Die DNS wurde auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer, Reutlingen) bei 306 nm sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem Video-Dokumentationssystem Gelprint 2000i (MWG Biotech, Ebersberg) fotografiert und auf hochauflösendem Thermopapier (Sony) ausgedruckt bzw. als Bilddokument (Tif-Format) auf einem Datenträger abgespeichert.

B.2.1.4.4. Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen:

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden der GeneClean II Kit (Fa. Bio 101) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Reinigung der DNS basiert hierbei auf seiner Bindung an hochfeinem Kieselalgenpulver. Die Elution der DNS erfolgte mit 20-30 µl 10 mM Tris pH 8,0.

B.2.1.4.5. Ligation von DNS-Fragmenten:

Isolierte Vektor- und Insert-DNS wurden je nach Fragmentgrößen in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:6, 100 ng Vektor, in die Ligationsreaktion (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Es wurde je 1 µl T4-DNS-Ligase von New England Biolabs (400 U/µl, Inkubation 1 Std. bei RT, oder 14°C ü.N.) verwendet.

B.2.1.4.6. Klonierung über freie, endständige T/A-Basen:

Das Prinzip dieser Klonierungsmethode beruht auf der Eigenart thermostabiler DNS-Polymerasen jeweils am 3'-Ende ein singuläres Desoxy-Adenosin anzuhängen. Möglichst frisch amplifizierte DNA kann daher direkt in einen geeigneten bakteriellen Klonierungsvektor (pCR™), der nur 3,9 kb gross ist, ligiert werden. Der Vektor weist jeweils am 5'-Ende ein überhängendes Desoxy-Thymidin auf und ist dephosphoryliert. Ein erfolgreich ligiertes Insert kann somit leicht bakteriell vermehrt werden. Positive Klone wurden durch Blau-Weiss Selektion auf LB_{Amp}-X-Gal (40 mg/ml DMSO-Stammlösung, 25 µl/Platte) Agarplatten identifiziert. Die TA-Klonierungsmethode ist besonders für schlecht ligierbare Fragmente von Vorteil. Die Klonierung grosser DNS-Fragmente oder die Verwendung von Restriktionsschnittstellen für Enzyme wie *PstI*, *XhoI* oder *NheI*, die nahe am Ende eines Fragmentes schlecht oder gar nicht schneiden wurden dadurch vereinfacht. Zur Ligation, nach Standardbedingungen, wurde das PCR-Produkt mittels PCR Quick Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 mit dem Vektor eingesetzt. Die ligierte DNA wurde in kompetente Zellen (OneShot™ INVαF') transformiert. Zur Inkubation der transfizierten Bakterien bei 37°C wurde SOC-Medium verwendet (Bactotrypton 2 %, Hefeextrakt 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glukose 20 mM). Mit Hilfe der über die PCR-Primer eingebrachten Schnittstellen wurde schließlich das Fragment ausgeschnitten und in einen eukaryotischen Expressionsvektor subkloniert.

B.2.1.4.7. Herstellung transformationskompetenter Bakterien:

Bakterien, die sich in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden bei einer OD_{595nm} von 0,6 geerntet und sofort danach in eiskaltem sterilem Transfektionspuffer I (TFB I; 30 mM KAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (87 %), später 40 mM MnCl₂) resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (4000 rpm, 5') wurden die Bakterien vorsichtig in TFB II (10 mM Mops pH 7,0; 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin) aufgenommen, sofort in Reaktionsgefässe aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

B.2.1.4.8. Transformation, Analyse und Präparation von Plasmid-DNS:

Die Transformation von Plasmid-DNS in *E.coli* erfolgte nach dem Stratagene-Protokoll für kompetente Bakterien (100 µl komp. Bakterien +50 ng ligiertes Plasmid; 45 min 4°C, 60 sec. 42°C, 1 h 37°C in 1 ml LB, Ausplattieren von 100 µl auf LB_{Amp}-Platten, Bebrütung bei 37°C über Nacht). Wenn nicht anders angegeben, wurde als Selektionsantibiotikum Ampicillin eingesetzt. Die Charakterisierung von Klonen erfolgte durch Plasmidpräparation (Alkalische Schnellyse nach Birnboim und Doly, 1979) aus Übernacht-Flüssigkulturen (in LB-Medium) von Einzelkolonien und anschließender Restriktionsanalyse. Bei größeren Mengen zu analysierender Klone wurde anstatt dessen eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurden geeignete Primer zur Amplifikation des gesuchten Ligationsproduktes sowie zur Ermittlung dessen Orientierung im Plasmid ausgewählt. Von positiven Klonen wurde DNS für weitere Verwendungen (Klonierung, Sequenzierung, Transfektion) im präparativen Maßstab in 30-500 ml LB_{Amp}-Kulturen ü.N. vermehrt, mittels Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) geerntet und über Qiagen-Säulen isoliert. Die Reinigung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen). Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden photometrisch mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers Kontron 930 (Uvikon, Darmstadt), in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) bestimmt. Es wurde ein UV-Absorptionkoeffizient der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm gemessen und der Wert bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung herangezogen (1 OD_{260nm} = 50 µg Plasmid-DNS/ml, 40 µg RNS/ml oder 20 µg Oligonukleotid/ml).

B.2.1.4.9. Präparative Reinigung von Plasmid-DNS für die Transfektion in eukaryotische Zellen:

Plasmid-DNS für die Transfektion in eukaryotische Zellen wurde besonders sauber präpariert. Die bei der Plasmidpräparation aus der Bakterienmembran freigesetzten Lipopolysaccharide (LPS) stellen bei der Transfektion bei sehr vielen Zellen ein besonderes Problem dar. Ihre endotoxische Wirkung, abhängig von ihrer Konzentration in der gereinigten DNS, verursacht teilweise deutlich geringere Expressionsraten des transfizierten Fremdgens, bedingt durch einen schlechten Allgemeinzustand und einer höheren Sterberate der Zellen. Ein spezieller Plasmidreinigungs-kit (EndoFree Plasmid Purification Kit, Qiagen Hilden) ermöglicht die Abtrennung der LPS bei der Bindung der DNS an die Säulenmatrix. Die Konzentration an LPS sinkt deutlich von ca. 17 ng auf unter 1 ng LPS / µg DNS (laut Angabe des Herstellers). Die Effizienz der Transfektion mit dieser DNS war teilweise dreimal höher

B.2.1.4.10. Sequenzspezifische Mutation von Plasmid-DNS:

Mit Hilfe des QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kits (Stratagene, Heidelberg), der auf der Standard-PCR Reaktion basiert, konnten mittels zweier komplementären Oligonukleotid-Primer, die jeweils an der gleichen Stelle die zum Ausgangsplasmid gewünschten Punktmutationen enthielten, die gewünschten Veränderungen in der DNS-Sequenz eingeführt werden. Die hier verwendete *Pfu* DNA-Polymerase weist eine für diese Reaktion wichtige Korrekturaktivität auf, um Mutationen des Tochterstranges durch die PCR zu vermeiden. Des weiteren wird bei dieser Methode die methylierte Mutterstrang-DNS durch eine spezielle DNase abgebaut, während die neu synthetisierte Tochterstrang-DNS mit den über die Primer eingeführten Mutationen davon nicht betroffen ist. So wird es ermöglicht, dass sich die beiden komplementären ringförmigen singulären DNS-Moleküle zu einem doppelsträngigen Plasmid vereinigen können. Die punktmutierte Plasmid-DNS wurde anschliessend in kompetente Bakterien transformiert und vermehrt.

B.2.1.4.11. DNS-Sequenzierung:

Die Sequenzierung von Plasmid-DNS wurde von den Angestellten des Institutes Josef Köstler bzw. Holger Melzl mittels automatischem Taq-Cycle-Sequencing (TACS) von Applied Biosystems durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqEd®, Version 1.0.3 (Applied Biosystems) auf einem Apple Power Macintosh-Computer.

B.2.1.5. Isolierung genomischer DNS aus Eukaryontenzellen

Für den Nachweis der stabilen episomalen Vermehrung transfizierter EBV-abgeleiteter Vektoren in B-Zellen wurde die genomische DNS der Wirtszelle zunächst einige Wochen nach Transfektion präpariert. Zur Bestätigung wurde dieser Vorgang ca. 2 Monate später wiederholt. Dazu wurden 1×10^7 transfizierte B-Zellen 2x in PBS-Puffer gewaschen und danach in 200 μ l PBS resuspendiert. Unter Verwendung des "QIAamp Blood Kit" (Qiagen, Hilden) wurden die Zellen in Proteinase K haltigem Puffer AL lysiert und für 10 min bei 70°C inkubiert. Zur leichteren Verarbeitung der gallertigen Flüssigkeit wurde die chromosomale DNS vorher geschert. Nach der Proteinase K Behandlung und Zugabe von 1/3 Vol. Isopropanol wurde die Lösung durch eine spezielle Tischzentrifugationssäule zentrifugiert. Die gebundenen Nukleinsäuren wurden nach mehreren Waschschritten mit 200 μ l TE-Puffer eluiert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist ausführlich im Protokoll des Herstellers beschrieben. Die Präsenz episomaler Plasmid-DNS wurde durch anschliessende Elektrotransformation von 1 μ l

dieser Elutionslösung in elektrokompetente *E.Coli* Bakterien und deren Bebrütung auf LB_{Amp}-Agarplatten nachgewiesen. Lag das Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen in episomaler Form in den transfizierten B-Zellen vor, konnten positive Klone identifiziert werden.

B.2.2. Analyse rekombinanter Proteine

B.2.2.1. Herstellung von Zell-Lysaten

B.2.2.1.1. Lysate von E.coli:

Aus einer Übernacht-Kultur von rekombinanten Bakterien wurden 500 µl Kultur entnommen, in 5 ml frisches Medium gegeben und 1 Std. bei 37°C weiter geschüttelt. Nach Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalaktosidase (IPTG) (1 mM Endkonzentration) wurde die Kultur noch weitere 2 Std. bei 37°C inkubiert. 1,5 ml Kultur wurden geerntet, die Zellen sedimentiert (4000 rpm, 5 Min.) und in 400 µl H₂O + 100 µl 5x Probenauftragspuffer (40 % w/v Saccharose, 2,5 % w/v SDS, 0,5 M Tris/HCl pH 7,0, 0,20 % w/v Bromphenolblau, 10 mg/ml DTE oder 2 % v/v β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 3 min. aufgekocht.

B.2.2.1.2. Lysate aus Zellkulturen:

Suspensionszellen wurden bei 800 rpm 5 min abzentrifugiert (Rotixa, Hettich) und zweimal mit PBS gewaschen. Das erhaltene Zellsediment wurde in 500 µl PBS aufgenommen. Adhärenz Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml PBS wurde die Zellschicht mit einem Zellschaber abgelöst, bei 800 rpm zentrifugiert und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen. In beiden Fällen wurden 4/5 der Zellen erneut zentrifugiert, danach der Überstand entfernt und die Zellen in 100 µl Probenauftragspuffer gelöst (etwa $0,4 \times 10^7$ Zellen). Das restliche Fünftel der Zellen wurde für weitere Analysemethoden wie Immunfluoreszenz, FACS-Scan oder ELISA bei 4°C aufbewahrt.

B.2.2.2. Quantitative Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe, wurde der Protein-Bestimmungstest nach Bradford der Firma Bio-Rad durchgeführt. Das Färbereagenz dieses Testsystems bindet an Proteine und unterliegt dabei einer Farbveränderung, welche photometrisch durch eine Absorptionszunahme bei 595 nm detektiert werden kann. Aus dem Vergleich der gemessenen OD_{595nm} mit den Werten einer Eichkurve von 1 bis 10 µg BSA Proteinstandard (Extinktionskoeffizient $\epsilon = 0,667 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{d}$; $c = A / (\epsilon \cdot d)$) lässt sich die Proteinmenge in der Probe

näherungsweise ermitteln. Hierzu wurde eine Eichgerade über lineare Regression erstellt aus der die ungefähre Proteinkonzentration der gemessenen Proben errechnet werden konnte.

B.2.2.3. Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren eigene positive oder negative Ladungen. Als Folge werden die Proteine nur ihrer Größe entsprechend im elektrischen Feld in Richtung Anode bewegt. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proteinproben unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (5 %, pH 6,8) konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche Trenngel (15 %, pH 8,8) ein. Die Proteinproben wurden vor dem Aufbringen auf das Gel mit 1/5 des Volumens eines 5-fach konzentrierten Probenauftragspuffers (40 % w/v Saccharose, 2,5 % w/v SDS, 0,5 M Tris/HCl pH 7,0, 0,20 % w/v Bromphenolblau, 10 mg/ml DTE oder 2 % v/v β -Mercaptoethanol) versetzt und max. 3 Min. im Heizblock bei 96°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Tris-Glyzin-Laufpuffer bei 20-25 mA Stromstärke pro Gel (15 g Tris, 72 g Glycin, 25 ml 20 % SDS auf 5 l mit H₂O bid.). Nach der SDS-PAGE konnten die aufgetrennten Proteine über die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau (Sambrook *et al.* 1989) nachgewiesen werden.

B.2.2.4. Western-Blot Analyse

B.2.2.4.1. Proteintransfer auf Nitrozellulose:

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf Protran Nitrozellulose (BA 85, 0,45 μ m, Schleicher & Schuell) oder Immobilon Nitrozellulose (NC pure, 0,22 μ m, Millipore) wurde mit einer Elektro-Blot-Apparatur (FastBlot, BioMetra) in einem leitfähigen Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,3 ohne Titration) erzielt. Bei einer Spannung von 15 bis 20 V und bei einem Stromfluss von max 0,5 mA/cm² Gelfläche gelang ein nahezu quantitativer Transfer in ca. 30 min. Durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung (Sambrook *et al.*, 1989) wurde der Transfer überprüft. Die Positionen der Proteine des Molekulargewichtsstandards konnten so mit einem Kugelschreiber markiert werden. Anschließend wurde die Färbung mit TPBS (PBS + 0,02 % Tween 20) wieder ausgewaschen.

B.2.2.4.2. Bindung des spezifischen Antikörpers:

Nach dem Proteintransfer wurden die noch freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran für mindestens 2-6 h bei RT mit einer 5 %-igen Lösung von Magermilchpulver in PBS oder 2 %-iger Casein Lösung (Schleicher & Schuell) unter leichtem Schütteln abgesättigt. Danach wurde der Blot dreimal für mindestens 10 min mit TPBS gewaschen, bevor er für 2 bis 12 Std. mit einer 1:2000 bis 1:4000 Verdünnung des spezifischen Antikörpers in PBS inkubiert wurde.

B.2.2.4.3. Detektion der Proteine durch chromogene Färbung:

Nach der Bindung des spezifischen Antikörpers wurde der Nitrozellulosefilter dreimal für 10 min mit TPBS gewaschen und danach mindestens 1 h mit einer 1:1000 bis 1:5000 Verdünnung eines mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelten mAk geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschriff folgte die Inkubation des Filters mit den Substraten der alkalischen Phosphatase (Sambrook *et al.* 1989). Der Filter wurde dazu in AP-Puffer (0,1 M Tris Base, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂ x6 H₂O, pH 9,5) äquibriert und dann in 15 ml einer Lösung von 66 µl NBT (p-Nitroblue-tetrazolium-chlorid) und 33 µl BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-dinatriumphosphat) im Dunkeln ohne Schütteln entwickelt, bis die Proteinbanden angefärbt waren. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von PBS + 20 mM EDTA gestoppt.

B.2.2.4.4. Detektion der Proteine durch Chemolumineszenz:

Alternativ wurden mit einer wesentlich sensitiveren Methode alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper durch die enzymatische Aktivierung eines chemolumineszierenden Substrates (CDP-StarTM, Tropix), und der anschließenden Belichtung eines Röntgenfilms für 2 min bis 1 h (X-OMAT, Kodak) detektiert. Hierfür wurden die oben angegebenen höheren Verdünnungen der Antikörper eingesetzt. Die gebrauchsfertige CDP-StarTM-Lösung (1, 2 Dioxethan-Chemolumineszenz-Substrat) wurde für die Verwendung auf Nitrozellulosefiltern 1:20 mit Nitroblock II gemischt, um auf dem Filter eine hydrophobe Umgebung zu schaffen und dadurch die Signalstärke deutlich zu erhöhen. Die Aktivität der AP führt zur Freisetzung von Lichtquanten, die an den entsprechenden Stellen auf dem Filter den aufgelegten Film schwärzen. Je Filter wurden nur ca. 1 ml dieser Lösung zur 5 minütigen Inkubation benötigt. Danach wurde der Filter ohne Flüssigkeit in Cellophan-Folie eingewickelt und in die Entwicklungskassette gelegt.

B.2.2.5. Nachweis des zytoplasmatischen HIV-1 p55 Antigens im ELISA-Format

Zum Nachweis und zur Quantifizierung des HIV-1 p55-Vorläuferproteins aus Zell-Lysaten wurden der HIV-AG-1 monoklonale Testkit der Firma Abbot, sowie der p24-core ELISA Kit der Firma Dupont verwendet. Beide Testkits erkannten auch nicht prozessiertes p55 Gag Protein, jedoch weniger sensitiv. Der DuPont ELISA war dabei deutlich empfindlicher und die Proteinmenge konnte genauer quantifiziert werden als mit Hilfe des Tests von Abbot. Alle Schritte wurden nach den Protokollangaben der Hersteller durchgeführt.

B.2.2.6. Immunfluoreszenz

Zum Nachweis des intrazellulären pr55-Gag Vorläuferproteins und des kotransfizierten Rev-Proteins wurden entweder ca. 1×10^4 - 1×10^5 Suspensionszellen auf einen Objektträger aufgetragen und im Luftstrom der Sterilbank eingetrocknet, oder adherent wachsende Zellen direkt auf sterilen Objektträgern (\varnothing 12 mm) kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit einem Gemisch aus 1:1 von Methanol:Aceton oder mittels frisch zubereitetem Paraformaldehyd (3,7 % w/v in PBS). Danach wurden die noch feuchten Zellen mit je 40 μ l 1:100 bis 1:200 in PBS verdünntem mAk 13/5 bzw. 16/4/2, bzw. 1:50 verdünntem Humanserum eines HIV Patienten in einer feuchten Kammer inkubiert (1 h, 37°C). Primäre und sekundäre Antikörper wurden vor Verwendung in einem größeren Volumen verdünnt und 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert, um Präzipitate zu entfernen. Diese verursachen ansonsten störende fluoreszierende Flecken und beeinträchtigen das Gesamtergebnis der Immunfluoreszenz. Nach intensiven Waschschritten (je 3x mit reichlich PBS nach jeder Inkubation) wurde der entsprechende zweite, FITC oder Texas-Rot gekoppelte Antikörper (anti-Maus bzw. anti-Human; DAKO A/S, Glostrup, Dänemark), in einem Volumen von 50 μ l, 1:50 -1:100 Verdünnung aufgetragen und erneut inkubiert (1^{1/2} h, 37°C). Nach erneuten Waschschritten wurden die Objektträger mit einem Deckglas und einer speziellen Versiegelungslösung (Fluoromount, Dako) versiegelt. Zur Analyse der Fluoreszenz und zur Dokumentation wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX 70), ausgerüstet mit einer Quecksilberdampflampe und automatischer Kamera (Leica, Wetzlar) verwendet.

B.2.3. Zellkultur Techniken

B.2.3.1. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, (improved, Fa. Brand) bestimmt. 50 μ l einer gründlich resuspendierten Zellkultur wurden mit der gleichen Menge einer 0,5 %-igen Trypanblau-Lösung (PBS) vermischt. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein wodurch

diese leicht von den lebenden leuchtend transparenten Zellen zu unterscheiden sind. Die ermittelte Zellzahl n von Zellen aus 2×16 Kleinquadraten entspricht dabei, unter Berücksichtigung der Verdünnung, einer Konzentration von $n \times 10^4$ Zellen / ml Medium.

B.2.3.2. Kultivierung von adherent wachsenden Zellkulturen

HeLa-, Cos7- und H1299-Zellen wurden in DMEM (siehe Tab. 3) kultiviert. Die optimale Wachstumstemperatur lag bei 37°C. Die Zellen wurden alle 5 Tage bis 1x wöchentlich mittels einer Trypsin / EDTA-Lösung (Gibco, Life Technology, Eggenstein) von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt. Die Zellzahl pro ml Medium lag danach bei ca. 3×10^5 .

B.2.3.3. Kultivierung von Suspensionskulturen

CEM-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (siehe Tab. 3) bei einer Temperatur von 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Je nach Zellteilungsrate wurden die Zellen ein bis zweimal wöchentlich 1:3 bis 1:4 in frischem Medium verdünnt.

B-Zelllinien, immortalisiert durch Superinfektion mit EBV, wurden von Dr. Stefan Haist übernommen und für HIV-1 Gag Expressionsstudien verwendet. Die Zellen stammen aus HIV-positiven Blutspendern und wurden aus PBMC in RPMI 1640-Medium angereichert. Die mit einem Gag-Expressionsplasmid transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 2,5 mM Histidinol (Sigma, Deisenhofen), 1 M Stammlösung in 1 M Hepes, selektioniert.

B.2.3.4. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Damit sich möglichst viele vitale Zellen in logarithmischer Wachstumsphase befinden, wurden die zur Transfektion bestimmten Zellen in grossen Kulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, USA) bis zu einer max. Zelldichte von ca. 80 % herangezogen (adhärente Zellen) oder am Vortag ca. 24 h vor der Ernte nochmals mit frischem Medium versorgt (Suspensionszellen).

Elektroporation:

Die Zellen wurden geerntet, in PBS aufgenommen und mehrmals mit PBS gewaschen (800 rpm, 5 min). Der Standardansatz für die Elektroporation von Zellen war 1×10^7 Zellen in 500 µl PBS (ohne Mg²⁺- und Ca²⁺ Salze), 20-40 µg DNS, U=200-250 Volt, R=90 Ohm, C=900-1600 µFarad. Mit sterilen Einmalplastik-Pasteurpipetten wurden sie in Elektroporationsküvetten mit der DNS suspendiert und mit dem Elektroporator EasyJect-Plus (Eurogentec, Niederlande) einem einzigen Stromstoss unterzogen. Anschliessend wurden die Zellen in 10 ml frischem,

vorgewärmten Medium resuspendiert und mindestens 24 h bebrütet bevor das Medium erneuert wurde. Nach weiteren 24 h erfolgte entweder der Nachweis der Proteinexpression oder der Zusatz des Selektionsmediums zur Anreicherung transfizierter Zellen in Langzeitkulturen.

B.2.3.4.1. Kalziumphosphat-Transfektion:

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte für Transfektionsexperimente in Petrischalen oder Kulturschalen mit 6 Näpfen. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen zu $2,5 \times 10^5$ Zellen/Napf oder 1×10^6 Zellen / Petrischale ausgesät. Ca. 3 h vor der Transfektion wurde das Medium nochmals erneuert. Die adhärenenten Zellen wurden bis auf wenige Vorversuche ausschliesslich mittels Kalziumphosphat präzipitierter DNS transfiziert. Hierzu wurde in sterilen Einmalreaktionsgefässen jeweils 500 µl Ca_2PO_4 -Puffer (0,25 mM) vorgelegt, anschliessend die DNS (5-10 µg) und zum Schluss 500 µl 2 x HeBs-Puffer (0,28 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4 pH exakt 7,05) hinzugegeben. Die Reaktionsgefässe wurden verschlossen und mehrmals gut geschüttelt. Nach mindestens 20 min Inkubationszeit (Kristallisierungsprozess) wurde die Lösung auf die Zellen geträufelt und in Napf / Petrischale gleichmässig verteilt. Für die nächsten 12 h erfolgte die Inkubation der Zellen in einem Brutschrank mit nur 35°C Temperatur und 3 % CO_2 -Gehalt, da dies einen zusätzlichen Stress für die Zellen bedeutet und deren Bereitschaft zur Aufnahme von DNS erhöhte. Nicht aufgenommene DNS-Kristalle wurden durch Wechseln des Mediums und Waschen mit PBS größtenteils entfernt. Nach weiteren 36 h wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und in PBS oder Lysepuffer aufgenommen.

B.2.3.5. Ermittlung der Transfektionseffizienz

B.2.3.5.1. SEAP Enzymaktivitätsmessung:

Eine thermostabile Form der sezernierten plazentalen alkalischen Phosphatase (SEAP, Expressionsplasmid pSV2AP), (Cullen, B., Methods in Enzymology 1992) wurde zur Überprüfung der Transfektionseffizienz verwendet und vor allem zur Optimierung der Transfektionsparameter bei der Elektroporation benutzt. Der SV40-Promoter wurde von Mathias Vogel im Institut für medizinische Mikrobiologie durch den CMV-Promoter ersetzt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der PhosphaLight-Chemoluminescent Reporter Gene Assay (Promega, USA) diente zur Ermittlung der Enzymaktivität. Bereits 27,5 µl Medium aus der transfizierten Kultur, aufgenommen in 82,5 µl Verdünnungspuffer, genügten um die Messung durchführen zu können. Während einer 45 min Inkubation der Proben bei 65°C wurden zelleigene AP-Enzyme zerstört, während die thermostabile AP anschliessend gemessen werden

konnte. Weitere Protokolldetails sind der genauen Anleitung des Herstellers zu entnehmen.

B.2.3.5.2. Optimierung der Transfektionsparameter mit Hilfe eines SEAP-Reporterplasmides

Mit einem Transfektionsapparat zur Elektroporation eukaryotischer Zellen (EasyJect Plus, Fa. Eurogentec, Belgien) wurden die bisher verwendeten Transfektionsparameter überprüft und optimiert. Hierfür wurde das Reporterplasmid pcmv-SEAP (Stratagene) eingesetzt, da diese Methode bereits in anderen Fragestellungen erfolgreich Verwendung fand (Vogel et al, 1997). Die Zellvitalität wurde jeweils vor dem Passagieren der Zellen durch Ermittlung und Vergleich der Zellzahl jeder transfizierten und nicht transfizierten Kultur bestimmt. Bei den Transfektionsparametern $U=240\text{ V}$, $R=100\ \Omega$ und $C=1350\ \mu\text{F}$ wurden optimale transiente Expressionsraten erzielt. Die ermittelte Abklingzeit der Pulsspannung τ (Relaxationszeit) betrug hierbei ca. 25-30 msec und die zu erwartende Überlebenszellzahl lag 24 h nach der Transfektion bei durchschnittlich 50 %. Die Transfektion des Reporterplasmides pcmv-GFP und die Messungen transfizierter B-Zellen 2 Tage später mittels FACS-Scan-Analysen ergaben hierbei Transfektionseffizienzen von 30-50 %, bezogen auf lebende Zellen.

B.2.3.5.3. β -Galactosidasefärbung:

Adhärenz auf Objektträgern wachsende Zellen wurden auch mittels Blaufärbung durch das Enzym β -Galaktosidase, die durch das Plasmid pCMV- β -Gal kotransfiziert wurde, untersucht. Wie bei der Blau-Weiss-Selektion bei der Bakterientransformation werden auch hier die Zellen angefärbt. Die Zellen wurden vorher mit Paraformaldehyd fixiert (siehe Fluoreszenzfärbung), und die Zellmembran anschliessend mit 0,05 % Triton/PBS Lösung für wenige Sekunden perforiert. Die Zellen wurden für 1-3 h mit β -Gal-Färbelösung inkubiert (5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ x3 H_2O II, 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ III, 2 mM MgCl_2 , X-gal-Färbereagenz 1 mg/ml) und schliesslich mit Elvanol versiegelt. Diese Methode diente aber nur zur ungefähren Abschätzung der Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop und eignete sich nicht zur Quantifizierung.

B.2.3.5.4. FACS-Scan Analyse:

50 μl der in PBS resuspendierten Zellen (ca. 2×10^5 Zellen) wurden in 200 μl PBS in Einmal-Polycarbonat-Plastikröhrchen verdünnt und direkt im FACS-Scan-Gerät gemessen (Einstellungen: FSC E-1, SSC I 84, FL-1 520, Threshold 520) Nach 10000 Zell-Zählungen wurde der Zählvorgang abgebrochen und die gemessenen Daten zur Auswertung im WinMDI FACS-Scan-Programm abgespeichert.

B.2.4. Techniken zur Untersuchung der Regulation des mRNS-Exports und der Translation

B.2.4.1. Dual Light Luziferase Assay

B.2.4.1.1. Prinzip des kombinierten Testsystems:

Beim Dual-LuziferaseTM Reporter Assay (Promega, USA) handelt es sich um ein Testsystem zur schnellen und genauen Erfassung der Luziferase-Aktivität in transfizierten Zellen. Da bei der Transfektion von Zellkulturen generell grössere Schwankungen bei den Messwerten zu erwarten sind, bedingt durch die unterschiedliche Vitalität der Zellen sowie die unterschiedlich effiziente Aufnahme der DNS bei der Transfektion, ist der Einsatz eines zweiten Expressionsplasmides mit konstanter Expression eines weiteren Reporterenzym als interne Referenz notwendig. Erst die relativen Messwerte der Reporteraktivitäten im Verhältnis zur Reporteraktivität des internen Standards ergeben verlässliche korrigierte Messwerte. In dem hier verwendeten System kommen zwei Luziferase-Enzyme unterschiedlicher Herkunft und mit unterschiedlicher biochemischer Reaktionsweise zum Einsatz. Während die Photinus-Luziferaseaktivität (Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) des Reporters unter der Kontrolle des SV40-Promoters steht, und in einem Mg^{2+} und direkt ATP-abhängigen Prozess Käfer-Luziferin unter Lichtfreisetzung oxidiert wird, handelt es sich bei der als internen Standard verwendeten Renilla-Luziferase (*Coelenterata Renilla reniformis*) um eine Mg^{2+} und ATP-unabhängige chemische Oxidationsreaktion mit Coelenterazine als Substrat. Die Expression der Renilla-Luziferase steht unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Die dem Testkit beigefügten Substrate und Reaktionspuffer sind so aufeinander abgestimmt, dass in einem ersten Schritt die Photinus-Luziferaseaktivität ermittelt wird, und in einem zweiten Schritt der Reaktionspuffer für die Renilla-Luziferase gleichzeitig die Photinus-Luziferaseaktivität durch Abfangen freier Mg^{2+} -Ionen und ATP in ihrer Aktivität um mehr als fünf Zehnerpotenzen unterdrückt (Quenching). Die Möglichkeit aus demselben Zellaufschluss beide Reporteraktivitäten messen zu können, erspart zeitaufwendige unabhängige Messungen von Enzymaktivitäten anderer Reporter wie z.B. SEAP oder CAT.

B.2.4.1.2. Testdurchführung:

Die in 6-Napf-Zellkulturplatten transfizierten Zellen wurden 48 h nach ihrer Transfektion einmal mit PBS gewaschen und anschliessend direkt in 1 ml eines dem Testkit beigefügten Lysepuffers aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch Inkubation bei RT und leichtem Schwenken auf einem Taumler-Schüttler (Polymax, Fa. Heidolph, Kehlheim) für 30 min. Die Lysate wurden direkt in den Test eingesetzt, bei 4°C ü.N. gehalten oder für einige Tage bei -20°C eingefroren. Die

Qualität der Messungen wurde dadurch nicht beeinflusst. Je 20 µl Lysat wurden zu 100 µl Reaktionspuffer I, vorgelegt in Einmal-Polycarbonat-Röhrchen, pipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen und zurückpipettieren mit dem Puffer rasch gemischt. Nun erfolgte die Messung im Luminometer (Lumat LB 9501, Fa. Berthold, München) für 10 sec. Danach wurden sofort 100 µl des zweiten Reaktionspuffers Stop & Glow zugegeben, kurz mit dem Vortex-Schüttler gemischt und erneut 10 sec gemessen. Die Reaktionspuffer mussten vor Beginn der Testdurchführung auf RT gebracht werden. Ihre Vorbereitung und Lagerung ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

B.2.4.2. Northern-Blot Analyse von isolierter Luziferase-RNS aus transfizierten Zellen

B.2.4.2.1. Allgemeine Hinweise:

Alle Geräte (Gelkammer, Kämmen etc.) wurden mit 2 M NaOH behandelt und mit Diethyl-Pyrokarbonat behandeltem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) ausgewaschen; alle Reagentien und Puffer wurden mit ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) vorbereitet; alle Enzyme wurden in RNase-freier Qualität eingekauft (Bezug ausschliesslich von Promega, USA und Ambion, USA); ausser bei der RNS-Präparation wurde grundsätzlich auf Eis gearbeitet; es wurden nur gestopfte, sterile Spitzen verwendet; zum Schutz vor Degradation durch RNasen wurde RNasin in einer Konzentration von 1 µl=40 Units auf 50 µl Probenvolumen zugegeben; Die Handschuhe wurden während der Arbeit häufig gewechselt und der Arbeitsplatz wurde vorher mit RNaseZapTM (Invitrogen, Niederlande) Lösung, einer Substanz zur Dekontamination von RNasen am Arbeitsplatz, gesäubert. Als Protokollvorlage diente ein ausführliches Buch von Promega (Protocols and Applications Guide), sowie die Beschreibung der Northern-Blot Methode in den "Current Protocols of Molecular Biology" (Wiley & Sons Inc., New York).

B.2.4.2.2. Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNS:

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus max. 1×10^7 frisch geernteten Zellen erfolgte bei Raumtemperatur mittels RNeasy Tischzentrifugationssäulchen (Qiagen, Hilden) analog dem ausführlichen Standardprotokoll des Herstellers. Hierbei können durch ein spezialisiertes Hoch-Salz-System bis zu 100 µg RNS mit mehr als 200 Basen Länge gewonnen werden. Zum Scheren der chromosomalen DNS wurden die lysierten Proben auf QiaShredderTM-Säulen aufgetragen und 1min bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert oder mit einer Spritze mehrmals durch eine dünne Nadel gepresst. Eventuelle DNS-Verunreinigungen wurden nach Elution der RNS mit RNase-freie DNase I, (Ambion, USA) in einer Endkonzentration von

2 U/50 µl DNase-Puffer (50 mM Tris; 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 50 µg/ml BSA, pH 7.5 =Puffer M (Restriktionsenzyme BM, evtl. MgCl₂ zugeben) entfernt (15 min, 37°C). Die DNase wurde anschliessend durch 20 min Inkubation bei 70°C inaktiviert. 1-2 µl RNasin (Promega; 40 U/µl) je 50 µl Volumen sowie 5 mM DTT wurden zum Schutz vor RNase-Abbau zugesetzt.

B.2.4.2.3. Isolierung zytoplasmatischer und nukleärer Gesamt-RNS:

Um die im Zellkern und im Zytoplasma vorliegende RNS getrennt präparieren zu können, wurden die Zellen vor der unter B.2.4.2.2 beschriebenen Methode zunächst einer milden Lyse in NP 40 Lysepuffer (50 mM Tris pH 8,0; 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 % NP 40 (10 %ige Lösung von Boehringer Mannheim), optional 500 Units RNasin / ml Puffer + 1 mM DTT) unterzogen. Danach wurden die jeweiligen Fraktionen in einem Verhältnis von 1:3,5 in dem chaotropen Puffer RLT aufgenommen und weiterverarbeitet oder eingefroren, ohne dass dies die Stabilität der RNS beeinflusste. Zum Scheren der chromosomalen DNS mussten hier nur die nukleären Fraktionen behandelt werden.

B.2.4.2.4. Anreicherung polyadenylierter mRNS:

Über die Bindung an oligo dT gekoppelte Polystyrol-Latex-Partikel (OligoTexTM, Qiagen, Hilden) wurden aus 200-300 µg Gesamt-RNS bis zu 2 µg polyadenylierte mRNS gewonnen. Hierzu wurden je 20 µl OligoTex-Suspension mit der Gesamt-RNS für 3 min auf 65°C erhitzt, 10 min bei RT inkubiert, mehrmals in speziellen Waschpuffern gewaschen und schliesslich 2 x mit je 50 µl 5 mM Tris-Puffer, pH 7,5 eluiert. Zur Bestimmung der mRNS-Konzentration wurde die gesamte Probe (100 µl) in RNase-freie Quarzküvetten überführt und photometrisch gemessen. Einer Absorption von 1 bei OD_{260nm} entspricht dabei eine RNS-Konzentration von 40 µg / ml. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Puffer ist dem ausführlichen Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

B.2.4.2.5. Herstellung und Lauf des Formaldehyd-Gels:

Isolierte Gesamt-RNS oder mRNS wurde in einer SpeedVac Vacuumkammer auf ein Volumen von 15 µl eingengt, in 30 µl Probenpuffer (50 % entionisiertes Formamid, 10 % 10x MOPS (0.4 M MOPS, pH 7.0, 0.1 mM NaAc, 10 mM EDTA), 2,2 M Formaldehyd (37 %=12,3 M), 1 % Ethidiumbromid) aufgenommen, 10 min bei 65°C erhitzt, zentrifugiert und schliesslich mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer (50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, H₂O_{DEPC}) vermischt. Pro Geltasche wurden bis zu 30 µg Gesamt-RNS oder 2 µg angereicherte mRNS aufgetragen und in einem Formaldehyd-Agarosegel (0,66 M Formaldehyd, 1,5 % Agarose)

aufgetrennt. Als RNS-Standard wurden 2-3 µg des Promega-Markers oder des Gibco Low Ladder Markers verwendet. Der Lauf eines grossen Gels in 1,5 Liter 1x MOPS-Puffer (bei ca. 100-160 mA dauerte 4-5 h (~1,5 cm / h). Währenddessen wurde der Laufpuffer 1 x gewechselt.

B.2.4.2.6. Transfer der aufgetrennten RNS auf eine Blot-Membran:

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Formaldehydgel auf einer Einmalfolie auf den UV-Schirm gelegt und im UV-Licht betrachtet. Die Markerbanden wurden zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal (0 cm=Position der Geltasche) zur späteren Ermittlung der richtigen Molekulargewichtsgröße fotografiert und abgespeichert. Anschliessend wurde das Gel mehrmals 5 min in H₂O_{DEPC} gewaschen, um das beim RNS-Transfer störende Formaldehyd zu entfernen. Ein weiterer Inkubationsschritt in 50 mM NaOH für 20 min diente zur Fragmentierung der RNS in kleinere Bruchstücke wodurch der Transfer auf die Blot-Membran beschleunigt wird. Nach 45 min Äquilibration des Gels in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrat 2 x H₂O, pH 7.0) wurde mit Hilfe eines Aufwärts-Kapillarblot-Verfahrens (siehe Current Protocols) für 6 h die RNS vom Gel auf eine positiv geladenen Nylonmembran (Biodyne Plus 0,45 µM, Pal Filtron Bioseparation, Dreieich) übertragen. Die Position der Geltaschen (=0 cm) wurde nach dem Transfer auf dem Filter markiert. Das Filter wurde für 5 min in 5 x SSC gewaschen, auf einem Papierfilter getrocknet und schliesslich mit einem Crosslinker (UV Stratalinker 2400, Stratagene) UV-quervernetzt und dadurch kovalent mit der Nylonmembran verbunden.

B.2.4.2.7. Herstellung einer DNS-Sonde:

Der Nachweis von mRNS-Transkripten im Zellkern und im Zytoplasma erfolgte durch Hybridisierung radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden mit der aus transfizierten Zellen gereinigten und über ein Formaldehydgel separierten Gesamt- oder mRNS. Zunächst wurden mit Hilfe des random primed labeling Kits (Ladderman, Takara Shuzo, Japan) eine markierte DNS-Sonde hergestellt. Für diese Reaktion wurden 100-200 ng DNS-Template, hergestellt durch PCR-Amplifikation oder durch Ausschneiden und Reinigen des gewünschten Fragments, und 2 µl nonamere Zufallsprimer in einem Ansatz von 14 µl Gesamtvolumen für 3 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2,5 µl Reaktionspuffer, 2,5 µl 0,2 mmol dNTP-Mix ohne dCTP, 1 µl (2 U) *BCA*-DNA-Polymerase (thermostabiles Enzym, isoliert aus *Bac. caldoteanax*), sowie 5 µl P³²CTP (50 µCi) zugegeben. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 55°C für 30 min. Eine anschliessende Inaktivierung des Enzyms war nicht notwendig, da die Sonde nach der Reinigung über Mini-Zentrifugationssäulchen (Centri-Spin, Princeton Separation, USA oder

Micro Bio-Spin, Bio-Rad München) sofort durch 10 min Aufkochen bei 95°C denaturiert wurde. Die Äquilibration der Zentrifugationssäulen erfolgte mit H₂O_{DEPC} oder Tris-Puffer 10 mM, pH 8,0. Die Sonde wurde in einem Volumen von 50 µl aufgetragen und bei 750 g eluiert.

B.2.4.2.8. Herstellung einer RNS-Sonde durch In Vitro-Transkription:

Einige Expressionsvektoren enthalten, sowohl 5' als auch 3' ihrer multiplen Klonierungsstelle gelegen, Bindestellen für Phagen-RNS-Polymerasen. Dies ermöglicht die Transkription eines klonierten offenen Leserasters sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Richtung. Das Plasmid pcDNA3 enthält eine 5'-T7 und 3'-T3 Phagenpromotersequenz und wurde zur Herstellung von radioaktiv markierter HIV-1-Gag RNS in antisense Richtung durch Verwendung der T3-RNS-Polymerase eines RNS-Transkriptionssystems verwendet (RiboProbe in vitro transcription assay, Promega, USA). In einem 20 µl Ansatz, 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 100 mM DTT, 4 µl 2,5 mM rNTP ohne rCTP, 20 Units RNasin, 2,5 µl 0,1 mM rCTP, 200 ng DNS-Template, 5 µl P³²-rCTP (50 µCi) und 20 Units T3-RNS-Polymerase wurde bei 37°C für 1 h das DNS-Template transkribiert. Danach wurde das DNS-Template durch Zugabe von 1 Unit RQ1-RNase-freie DNase 15 min bei 37°C entfernt. Schliesslich wurde die synthetisierte RNS durch Zentrifugation über Mini-Zentrifugationssäulen 2 min bei 750 g gefiltrationschromatographisch von nicht eingebautem rCTP, rNTPs und Puffer in einem Elutionsschritt gereinigt. Die RNS-Sonde wurde wie die oben beschriebene DNS-Sonde eingesetzt.

B.2.4.2.9. Hybridisierung der radioaktiven Sonde mit der filtergebundenen RNS:

Die Nylonfilter-Membran mit gebundener RNS wurde nun mit der Oberseite nach innen schauend in eine Hybridisierungsröhre geben (Biometra) und mit dem auf 42°C vorgewärmten Prähybridisierungspuffer (50 % Formamid, 5 x SSPE (20 x SSPE=3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat x 2 H₂O, pH 7,0), 5 x Denhardts-Lösung (100 x Denhardts-Lsg.: 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % Ficoll 400, 2 % BSA; bei -20°C lagern) und 400 µg/ml Hefe-tRNS (10 mg/ml in PBS)) für 6 h inkubiert, um freie Nukleinsäurebindestellen abzusättigen. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer bis auf 10 ml Restvolumen verworfen. Die gereinigte und für 10 min bei 95°C denaturierte DNS-Sonde wurde zugegeben und weiter bei 42°C für mindestens 6 h oder ü.N. hybridisiert. Danach wurde die Sondenlösung entfernt und die Membran durch Nachwaschen zunächst 2 x mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT und dann 2 x mit 0,1 x SSC Puffer, 0,1 % SDS bei 65°C von nicht spezifisch gebundener Sonde befreit. Zum Schluss wurde die Membran in 2 x SSC für 10 min inkubiert und in noch feuchtem Zustand in Cellophan-Folie verpackt.

B.2.4.2.10. Visualisierung der detektierten mRNS:

Die Membran wurde in einer Phosphor-Imager Entwicklungskassette (GS-363 Sample Loading Dock, Bio-Rad) für 1-6 h einem strahlungsempfindlichen Schirm exponiert (P^{32} -Imaging Screen BI, Bio-Rad München), dessen Beschichtung radioaktive Strahlung nach Anregung durch eine Laserlichtquelle in Lichtquanten umwandelt. Zur Abschätzung der radioaktiven Intensität der gebundenen Sonde wurde der Schirm schliesslich mit dem Laserscanner (GS-363, Bio-Rad) gescannt und mit dem Programm "Molecular Analyst" ein Tif-Bild des Northern-Blots erstellt. Grundsätzlich erfolgte auch noch die Belichtung eines Kodak X-Omat Filmes für 1-3 Tage unter Verwendung eines Intensifier-Screens bei -70°C , da die Signalauflösung hier deutlich bessere Ergebnisse lieferte als der Phosphorimager. Mit Hilfe des zu Beginn aufgenommen Bildes mit Lineal und dem Northern-Blot Bild konnte nun, eine Zuordnung von Molekulargewichtsgrössen detektierter Banden erfolgen. Zur Dokumentation wurde auch das Ergebniss der Filmexposition in Form eines Bilddokumentes (Tif-Datei) festgehalten. Zuletzt wurde die filtergebundene RNS mit einem Gemisch aus 5 % Essigsäure, 0,5 M NaAcetat pH 5,0 und 0,04 % Methylenblau für 10-15 min gefärbt und anschliessend unter stetigem Wechseln der blauen Lösung mit Wasser entfärbt bis nur noch die RNS-Banden zu sehen waren.

C. Ergebnisse

C.1. Transkription und mRNS-Export von HIV-1 *gag*-Gen-sequenzen

C.1.1. Ein Luziferase Reporter Assays zur Messung des nukleären mRNS-Exportes

Die Synthese des Gag-Vorläuferproteins von HIV-1 unterliegt *in vivo* einer strengen viruseigenen Kontrolle, die durch das regulatorisch wirkende Protein Rev und die Interaktion der viralen mRNS mit zellulären Faktoren erzielt wird. Um Untersuchungen zu Einflüssen auf die Expression von *gag* genauer und effektiver durchführen zu können, als dies mit Northern-RNS-Analysen möglich ist, wurde mit Hilfe des "Dual-Light-Luziferase-Assays" ein Reportersystem zur Messung der Effizienz des RNS-Exports etabliert. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der hochsensitiven luminometrischen Quantifizierbarkeit der Enzymaktivität exprimierter Luziferase (Luc). Fusionskonstrukte aus den Bestandteilen *luc*, RRE und *gag* wurden so kloniert, dass RRE- und Gag-Sequenzen stromabwärts des *luc*-Stopkodons lagen und daher die Fusionstranskripte ausschließlich für das Genprodukt Luziferase kodierten (Abb. 10). Im Fokus stand die Analyse von HIV-Sequenzbereichen innerhalb des *gag*-Gens, die den Export oder die Stabilität der transkribierten RNS möglicherweise beeinflussen. Sequenzmotive, die Störungen des RNS-Exports oder der Translation der Fusions-RNS-Transkripte bewirkten, würden durch eine veränderte Luziferaseexpression identifizierbar. Da *in vivo* der nukleäre Export von HIV-mRNS über die Interaktion und Bindung des frühen regulatorischen Proteins Rev an ein RNS-Schleifenmotiv geregelt ist, das im *env*-Bereich des HIV-Genoms lokalisiert ist, wurden neben verschiedenen *gag*-Sequenzen auch Sequenzen der RRE-Region in die Klonierung mit einbezogen. Auf diese Weise sollte eine durch *gag*-Sequenzen verursachte Kern-Retention von Fusions-RNS bei Kotransfektion eines Rev-Expressionsplasmides wieder aufgehoben werden können. Zeitaufwendige und nur schwer quantifizierbare Northern-Blot RNS-Analysen konnten so vermieden und eine Vielzahl relevanter Konstrukte untersucht werden.

C.1.1.1. Klonierung von RRE-gag Gensequenzen in das Luziferase-Reporterplasmid

C.1.1.1.1. Variation des Sequenzumfanges im Bereich des RRE

Der minimale funktionell aktive Sequenzbereich des RRE, der zur Ausbildung der RNS-Schleifenstruktur führt, ist mit 205 Basen beschrieben und erstreckt sich im *env*-Gen des verwendeten Isolat HIV-1_{HX10} von der Basenposition 7778 bis 7983. Innerhalb dieser Sequenz liegt die Region des Rev-bindenden Elementes (RBE) zwischen Position 7838 und 7908. Zur Untersuchung der Funktionalität des Rev/RRE-Mechanismus im Luziferase-Testsystem wurden mit den in Tab. 4 aufgeführten Primern verschieden lange RRE-Sequenzbereiche mit einer Länge von 270 Basen, 330 Basen, 505 Basen, 732 Basen und 854 Basen mittels PCR aus dem Genom von HIV-1_{HX10} amplifiziert. Diese RRE-Sequenzen wurden danach unmittelbar nach dem Stopkodon des Luziferasegens (*luc*) in die singuläre *Xba*I-Schnittstelle des Luziferase-Expressionsvektors "pGL-control" kloniert (Abb. 9). Die so generierten RRE-Fragmente enthielten den minimalen RRE-Bereich (RRE₂₇₀), sowie zusätzlich einen kurzen Sequenzbereich weiter stromaufwärts gelegen (RRE₃₃₀), oder weitere stromaufwärts und stromabwärts gelegene Sequenzen (RRE₅₀₅, RRE₇₃₂). Den größten Sequenzumfang hatte die RRE₈₅₄-Sequenz die stromabwärts bis über eine dort lokalisierte Spleiß-Akzeptorstelle reichte. Bei diesem RRE₈₅₄-Fragment handelte es sich um das für die Rev/RRE abhängige Expression von *gag* beschriebene *Bgl*II / *Bam*HI-Fragment (Mergener *et al.*, 1992). Durch die Variation der Länge der RRE-Fragmente sollten zusätzlich zum RBE weitere in der Nähe liegende Sequenzbereiche, sowie die suboptimale Spleiß-Akzeptorstelle im *env*-Gen mit Hilfe des Reportersystems analysiert werden. Mögliche relevante Interaktionsstellen für bisher noch nicht bekannte zelluläre Faktoren würden, wenn vorhanden, die Aktivität des Reporters beeinflussen und daher im Testsystem auffällig werden.

Fragment	Lokalisierung im Env-Gen	5'-Primer	3'-Primer
RRE ₂₇₀	7814-8079	RRE270-fc	RRE270/330b-rc
RRE ₃₃₀	7753-8079	RRE330b-fc	RRE270/330b-rc
RRE ₅₀₅	7666-8159	RRE505/732/854-fc	RRE505-rc
RRE ₇₃₂	7666-8386	RRE505/732/854-fc	RRE732-rc
RRE ₈₅₄	7666-8507	RRE505/732/854-fc	RRE854-rc

Tab. 4 Verschiedene verwendete RRE-Sequenzbereiche unterschiedlicher Länge und ihre Lokalisation im *env*-Gen. Die RRE-Sequenzen wurden mit den angegebenen Primern mittels PCR aus dem HIV-1 HX10-Genom amplifiziert.

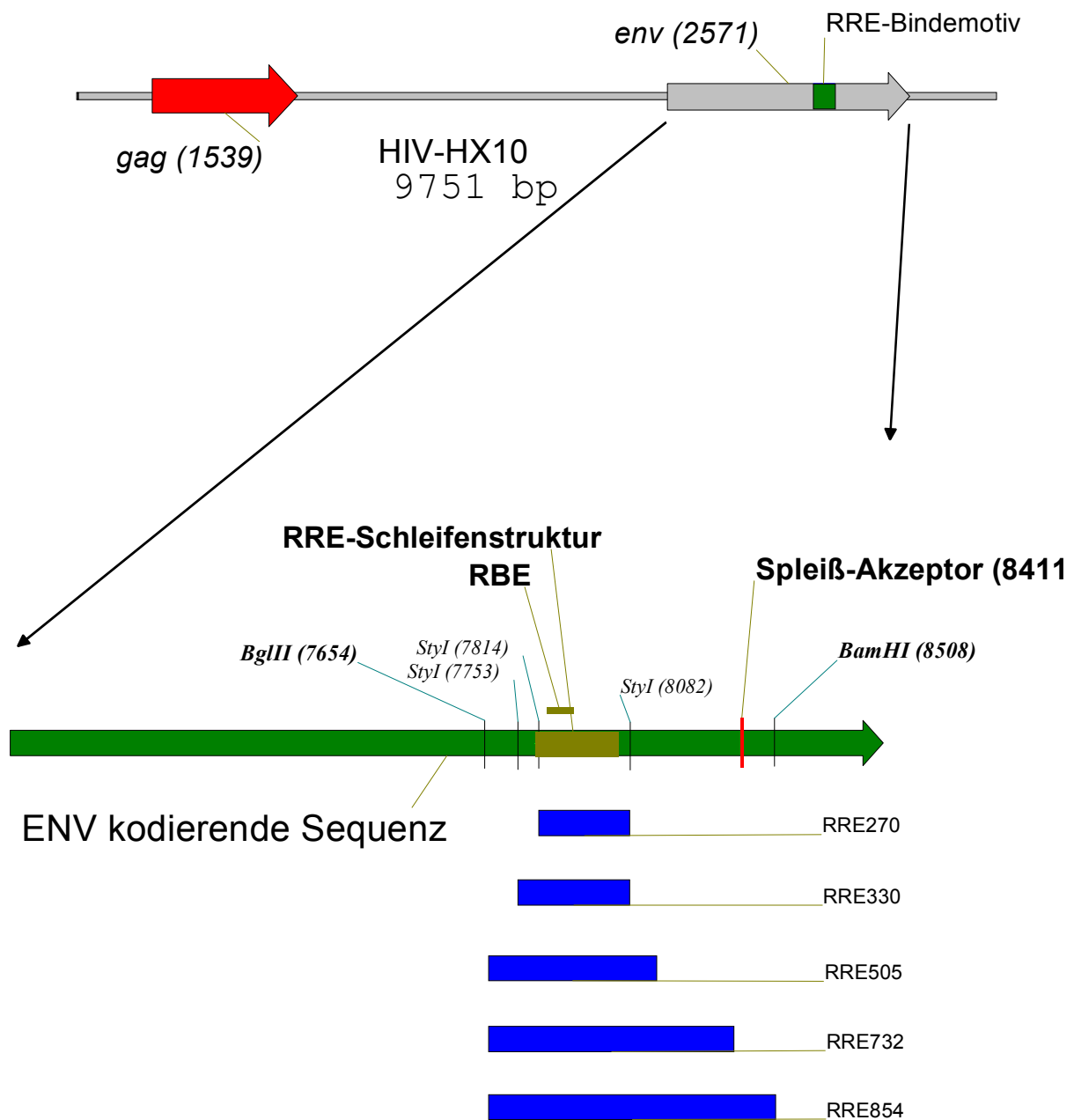


Abb. 7 Überblick über die Position von *env* im HIV-1 Genom und der Positionen des "Rev-Responsive Elements" (RRE), der Rev-Bindedomäne (RBE) sowie einer Spleißakzeptorstelle in der für *env* kodierenden Sequenz. Die verschieden großen RRE-Fragmente wurden mittels PCR aus *env* hergestellt.

Ein Überblick über die Lage des RRE, des RBE und der Position der 3'-Spleißstelle ist in Abb. 7 gegeben. Die daraus mittels PCR amplifizierten RRE-Fragmente und die hierfür verwendeten Primer sind in Tab. 2, Kapitel B zusammengefasst. Mit Hilfe computergestützter RNS-

Faltungsanalysen wurden die am wahrscheinlichsten zu erwartenden Sekundärstrukturen für alle RRE-Fragmente berechnet. In allen Fragmenten wurde die Schleifenstruktur des RRE eindeutig als energetisch stabilste RNS-Sekundärstruktur ermittelt, unabhängig davon, wie viele zusätzliche Basensequenzen über den minimalen RRE-Bereich hinaus noch vorhanden waren.

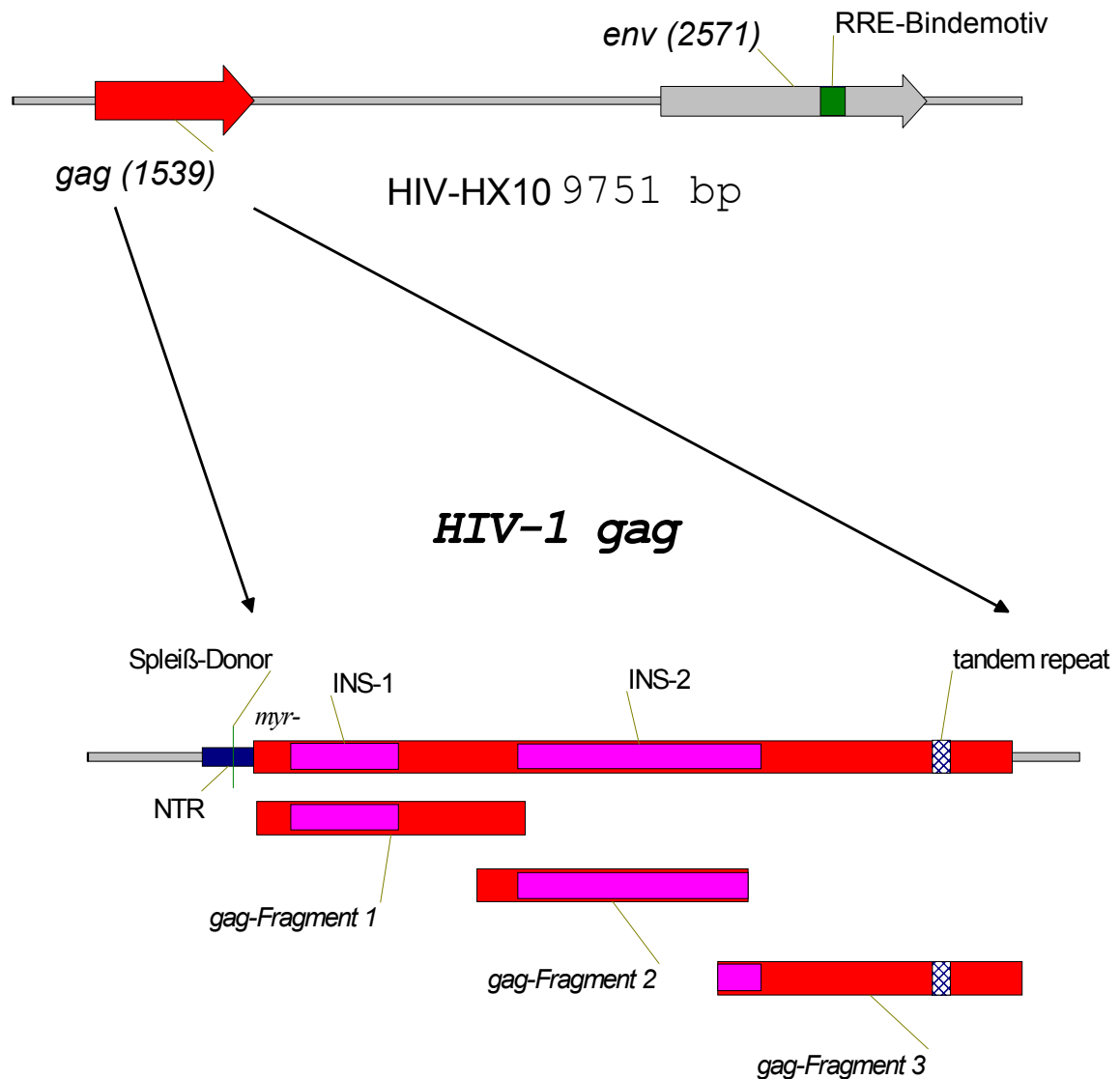


Abb. 8 Übersicht über die Sequenzorganisation von HIV-1 *gag*, und der amplifizierten Sequenzen (*gag* gesamt sowie die Fragmente *f1*, *f2* und *f3*). NTR (Pos. 685-788); INS-1 (Pos. 865-1082); INS-2 (Pos. 1325-1817); *gag* (Pos. 789-2327); Fragment-1 (Pos. 789-1338); Fragment-2 (Pos. 1243-1790); Fragment-3 (Pos. 1731-2347); Tandem-Repeat (36 Basen, Pos. 2166-2201); *myr* : Sequenz für Myristylierung deletiert.

Über die verwendeten RRE-Primer (Tab. 2, Kapitel B) wurden zusätzliche, für weitere Klonierungsschritte notwendige Schnittstellen eingebracht (Abb. 9). Die Schnittstelle *EcoRI* diente zum Einfügen der verschiedenen *gag*-Sequenzen in 3'-Orientierung von RRE gelegen. Die Schnittstelle *BssHII* im RRE-5'-Primer, zusätzlich mit einer weiteren *BssHII* Schnittstelle im 5'-Bereich der amplifizierten *gag*-Sequenz wurde zum späteren Ausschneiden der RRE-Sequenz verwendet (Rev-Negativkontrollplasmide). Die Restriktionsenzymchnittstelle *SalI* stromabwärts der Klonierungsstelle im Luziferase-Expressionsplasmid gelegen, sowie *XhoI* innerhalb der *gag*-Sequenz und zusätzlich im 3'-Primer des *gag*-Fragments lokalisiert, diente zur Überprüfung der Orientierung der eingefügten Sequenzen RRE und *gag*. Ferner wurden mit *SalI* und *XhoI* Kontrollrestriktionsanalysen der hergestellten Expressionsplasmide und später notwendige Umklonierungen in andere Vektoren durchgeführt.

Zur Analyse der Orientierung der klonierten Inserts wurden zusätzliche PCR-Primer verwendet (*luc-f*, RRE-1fs, RRE-2fs, RRE-rs, sowie die in den *gag*-Sequenzen gelegenen Primer; siehe Kapitel 2 Abb. 6), mit deren Hilfe nur bei richtiger Orientierung ein PCR-Produkt entstehen konnte.

Fragment	Lokalisierung im HIV-Genom	5'-Primer	3'-Primer
<i>gag</i>	789-2327	<i>gag5-1fc</i>	<i>gag5-6rc</i>
<i>f1</i>	789-1338	<i>gag5-1fc</i>	<i>f1 4-2rc</i>
<i>f2</i>	1243-1790	<i>f2 4-3fc</i>	<i>f2 4-4rc</i>
<i>f3</i>	1731-2347	<i>f3 5-5f</i>	<i>gag5-6rc</i>

Tab. 4 Für die Amplifikation der in Abb. 8 gezeigten *Gag*-Sequenzbereiche aus dem HIV-1 HX10-Genom wurden die hier angegebenen "PCR-Primer" verwendet.

C.1.1.1.2. Klonierung überlappender Sequenzbereiche des *gag*-Gens

In die zusammen mit den RRE-Fragmenten eingebrachte *EcoRI* Schnittstelle (Abb. 9-2) wurde nun die vollständige *gag*-Sequenz bzw. Teilsequenzen (Fragmente) kloniert. Die Klonierung von *gag*-Fragmenten ermöglichte die voneinander unabhängige Analyse verschiedener *gag*-Sequenzbereiche in diesem Testsystem. Die im *gag*-Gen lokalisierten INS-Sequenzen (Kapitel A, Abb. 1) sowie weitere bisher noch nicht identifizierte, möglicherweise regulatorisch bedeutsame Regionen sollten hierbei erfasst werden. In Abb. 8 ist der *gag*-Sequenzbereich, die überlappenden *gag*-Fragmente sowie der für später beschriebene Klonierungen wichtige nicht translatierte Bereich (NTR) mit Spleißdonorstelle dargestellt. Die zur Herstellung der *gag*-Fragmente eingesetzten PCR-Primer sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Alle amplifizierten RRE- und *gag*-Sequenzen wurden mit den in Tab. 2, Kapitel B aufgeführten Sequenzierprimern vollständig sequenziert. Für die RRE-Region ergaben sich in allen Fragmenten im Bereich der RRE-Schleifenstruktur folgende Punktmutationen: C₇₈₅₅ nach G; A₇₉₈₇ nach G; A₇₉₉₉ nach G; A₈₀₃₅ nach G und für HIV-*gag* ein Tandem-Repeat an Pos. 2166-2201. Diese von der HIV-1_{HXB2}-Sequenz abweichenden Basen wurden als funktionell unbedeutend beschrieben und sind auf die fehlende Lesekorrektur der RNS-Polymerase II zurückzuführen (Solomin *et al.*, 1990). Kontroll-Restriktionsanalysen, PCR-Analysen und Sequenzierungen mit geeigneten Primern ergaben für alle generierten Konstrukte die korrekte Orientierung und Länge der klonierten Sequenzen.

C.1.1.1.3. Klonierungsübersicht und Beschreibung der hergestellten Plasmide

In Abb. 9 sind schematisch die wichtigsten Klonierungsschritte zusammengefasst und zur Übersicht sind in Abb. 10, 12 und 13 die verschiedenen aus den Plasmidkonstrukten hervorgehenden Luziferase-Transkripte gegenübergestellt. Die multiple Klonierungsstelle des Ausgangsplasmides pGL-control wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Mlu*I und *Xho*I, eine Auffüllreaktion der überstehenden 5'-Enden mit dem Klenow-Enzym und dem Religieren der so hergestellten glatten Enden teilweise entfernt. Dieses in seiner MCS modifizierte Plasmid wurde pGL*-c genannt. pGL*-c besitzt unmittelbar hinter dem Stopkodon für das *luc*-Gen eine *Xba*I-Klonierungsstelle. Hier wurden die RRE-Sequenzen RRE₂₇₀ bzw. RRE₃₃₀ eingefügt, und es entstanden die Plasmide pGL-RRE₂₇₀ bzw. pGL-RRE₃₃₀ (Abb. 10, 1. u. 2.). Über die durch die RRE-Fragmente eingeführte *Eco*RI-Schnittstelle wurde anschließend die gesamte, 1539 Basen lange *gag*-Sequenz eingefügt und so die Plasmide pGL-RRE₂₇₀-*gag*, bzw. pGL-RRE₃₃₀-*gag* hergestellt (Abb. 10, 5. u. 6.). Das anschließende Ausschneiden der RRE₃₃₀-Sequenz aus dem Plasmid pGL-RRE₃₃₀-*gag*, oberhalb und unterhalb von RRE über die eingebrachten *Bss*HII Schnittstellen, und das Einfügen der anderen RRE-Sequenzen RRE₅₀₅, RRE₇₃₂ und RRE₈₅₄, führten zu den neuen Reporterplasmiden pGL-RRE₅₀₅-*gag*, pGL-RRE₇₃₂-*gag* und pGL-RRE₈₅₄-*gag*. (Abb. 10, 7., 8. u. 9.) Mit Hilfe der oberhalb und unterhalb von *gag* gelegenen *Eco*RI-Schnittstellen wurde nun die vollständige *gag*-Sequenz aus dem Plasmid pGL-RRE₃₃₀-*gag* entfernt und anstelle dessen die verschiedenen Teilsequenzen *gag*-f1, -f2 bzw. -f3 eingesetzt, wodurch die Plasmide pGL-RRE₃₃₀-f1, pGL-RRE₃₃₀-f2 bzw. pGL-RRE₃₃₀-f3 entstanden (Abb. 13, 2., 3. u. 4.). Das Kontroll-Plasmid pGL-RRE₈₅₄ (Abb. 10, 3.) wurde durch das Ausschneiden von *gag* aus dem Plasmid pGL-RRE₈₅₄-*gag* mittels *Eco*RI und anschließendem Religieren der Schnittstellen hergestellt. Die Luziferase-Reporterplasmide und ihr Verwendungszweck sind in Tab. 1, Kapitel B.1.3.4 zusammengefasst.

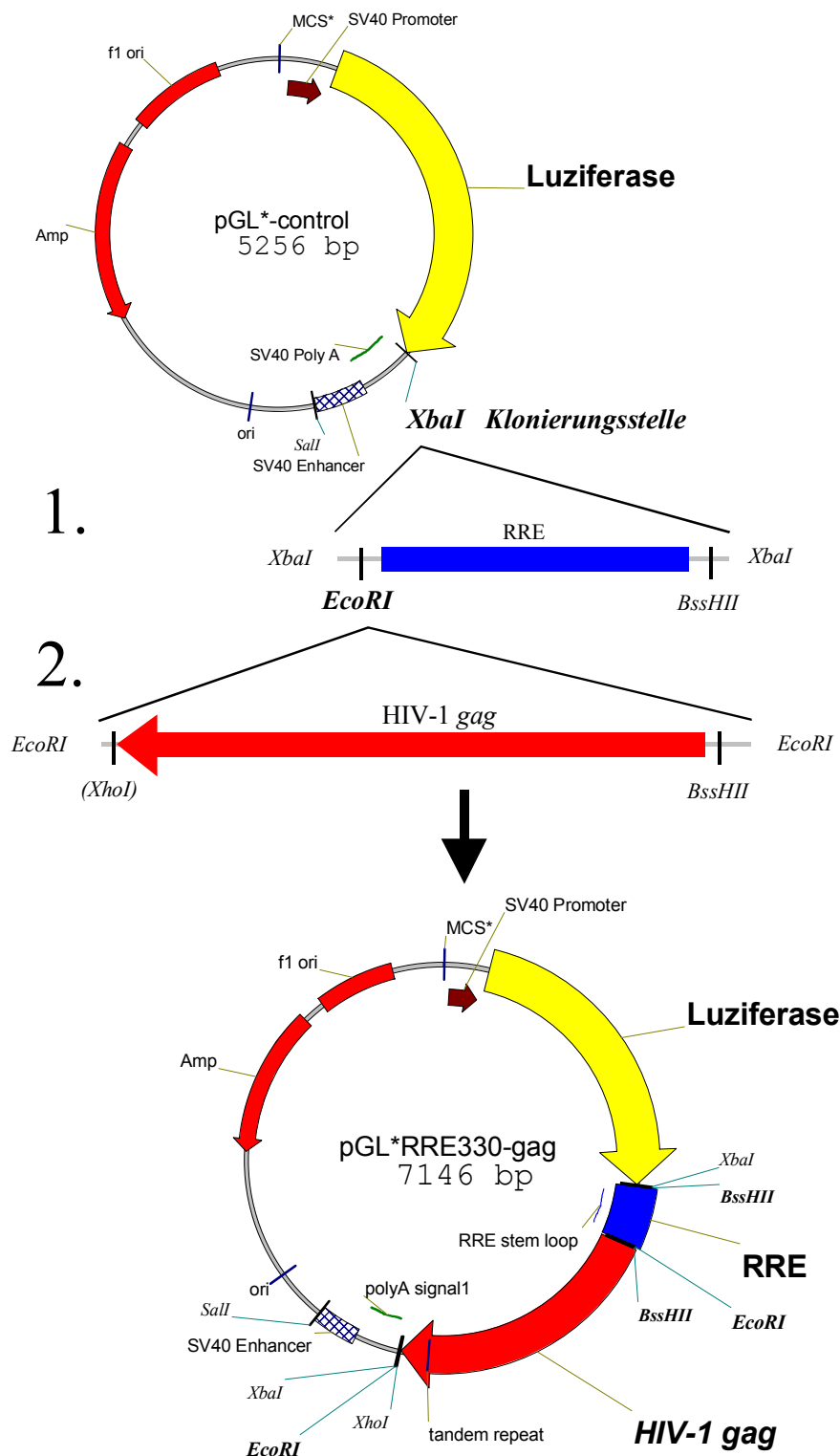


Abb. 9 Übersicht über die wesentlichen Klonierungsschritte zur Herstellung eines Luziferase-Reporterplasmides (pGL*-X). Die MCS ist um eine 12 Basen lange Sequenz verkürzt, wodurch die beiden Schnittstellen *MluI* und *XhoI* (MCS*) entfernt wurden. In die singuläre *XbaI* Klonierungsschnittstelle wurde zunächst das RRE₃₃₀-Fragment eingefügt(1.). Die dabei mitgebrachte *EcoRI* Schnittstelle am 3'-Ende des RRE wurde zum Einfügen der *gag*-Sequenz verwendet (2.). Im Produkt pGL-RRE₃₃₀-*gag* wurden über *BssHII* verschiedene RRE-Sequenzen eingesetzt, bzw. die vollständige *gag*-Sequenz durch Teilsequenzen (Fragmente 1-3) ersetzt.

Das Plasmid pGL-RRE₃₃₀(r)-*gag* mit falscher Orientierung des RRE₃₃₀ (nicht abgebildet) wurde durch Ausschneiden und Wiedereinfügen des RRE₃₃₀ und der Auswahl eines Klonen mit falsch orientiertem RRE₃₃₀ hergestellt. Es diente als Kontrolle für die Überprüfung der Rev-Funktion, die zwar unabhängig von der Lokalisation des RRE, aber abhängig von der Orientierung ist (Malim *et al.*, 1989). Das Plasmid pGL-*gag* (Abb. 10, 4.) wurde durch Ausschneiden des RRE₃₃₀ und anschließender Religation erhalten.

Ein letztes, nicht nach dem Klonierungsschema in Abb. 9 konstruiertes Plasmid pGL-*gag*-RRE₃₃₀ wurde hergestellt, um die Bedeutung der Lokalisation des RRE für die Rev-Funktion zu überprüfen (Abb. 12). Hierfür wurde das 330 Basen lange RRE-Fragment mit den Primern RRE330a-fc und RRE330a-rc amplifiziert. Die für die Insertion der *gag*-Sequenz benötigte *EcoRI* Schnittstelle lag hier in 5'-Orientierung der RRE-Sequenz. Die aus diesem Plasmid transkribierte mRNS hatte demnach die RRE-Schleifenstruktur am 3'-Ende des Moleküls. Im Luziferase-Reporterassay diente dieses Konstrukt zum Vergleich der Luziferase-Aktivitäten mit denen des Konstruktes pGL-RRE₃₃₀-*gag* in An- oder Abwesenheit von Rev-Protein.

C.1.1.2. Aktivität der Luziferase-Reporterkonstrukte

C.1.1.2.1. Einfluss unterschiedlich langer RRE-Nukleinsäuresequenzen auf den mRNS-Export

Zunächst wurden alle *luc*-RRE-*gag*-Reporterplasmide, die sich nur in der Länge des RRE-Fragmentes unterschieden, die Kontrollplasmide pGL-*gag* und pGL-RRE₃₃₀(r), sowie pGL*-c, pGL-RRE₃₃₀ und pGL-RRE₈₅₄ in HeLa-Zellen transfiziert, um den Einfluss verschieden langer RRE-Sequenzen auf den Export der mRNS zu ermitteln. Die aus diesen Konstrukten resultierenden mRNS-Transkripte sind in Abb. 10 zusammengefasst. Die Luziferasewerte wurden in mehreren unabhängigen Experimenten bestimmt (Abb. 11). Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit des RRE-Elements im Plasmid pGL-RRE₃₃₀ und pGL-RRE₈₅₄ im Vergleich zum pGL*-c Kontrollplasmid die Luziferaseaktivität um 40 % bzw. 60 % reduzierte. Um diesen durch CRS-Sequenzen im RRE selbst verursachten Effekt aus den Messergebnissen zu bereinigen, wurden alle erzielten Daten auf den Messwert des Konstruktes pGL-RRE₃₃₀ (= 100 % -Kontrolle) normiert. Bei Verwendung des RRE₃₃₀ war die höchste durch Kotransfektion von pc-Rev erreichbare Steigerung der Luziferaseaktivität erzielbar. Die Kotransfektion eines Rev-Expressionsplasmides führte zu einem weitgehenden Ausgleich der durch RRE verursachten geringeren Luziferaseaktivität.

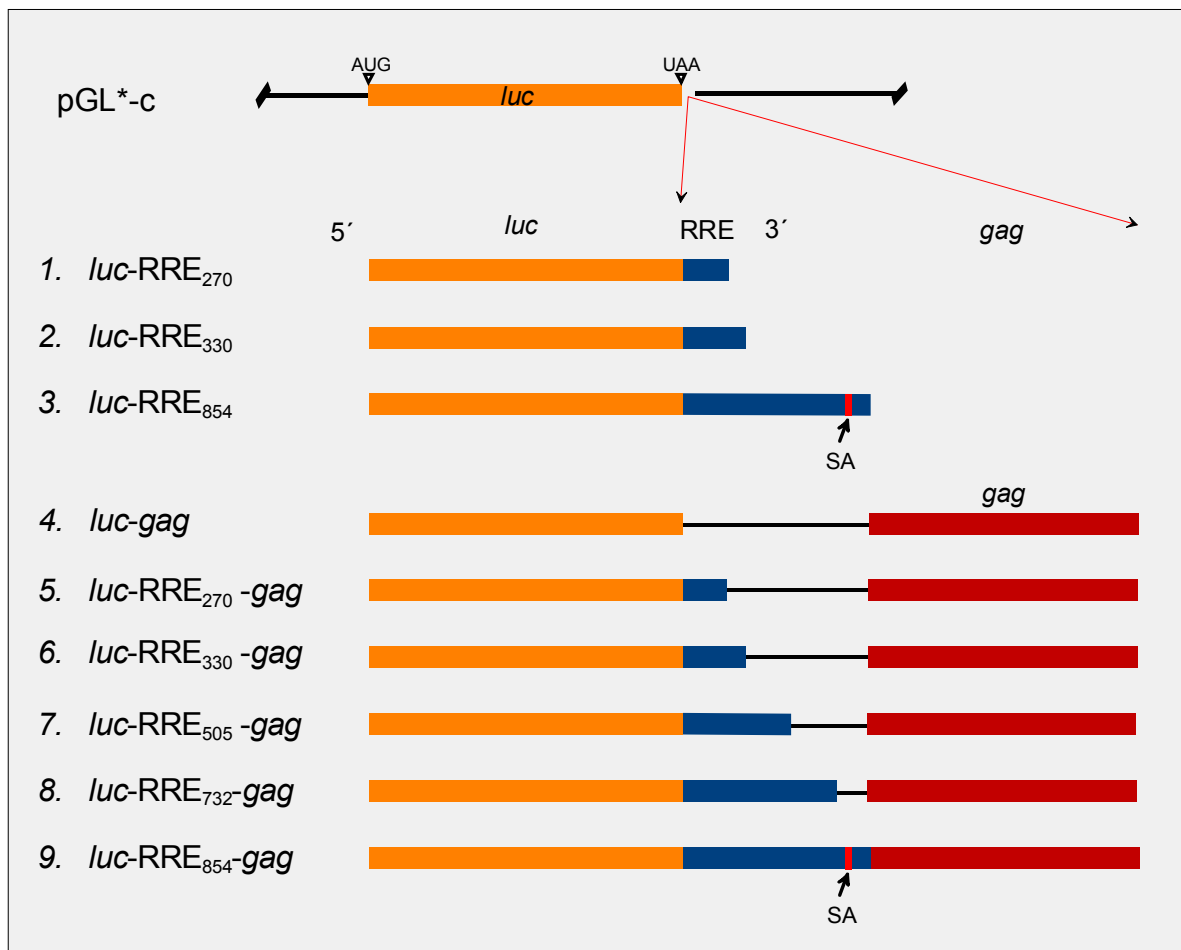


Abb. 10 mRNS-Transkripte der verschiedenen in pGL*-c klonierten Luciferase-Reporterplasmide mit unterschiedlich langen RRE-Sequenzen. Neben den Genabschnitten *luc*=Luziferase, RRE=Rev Responsive Element und *gag*=gruppenspez. Antigen ist die Spleißakzeptorstelle (SA) gekennzeichnet, die in dem langen RRE854-Sequenzabschnitten enthalten ist.

Das Konstrukt pGL-RRE₃₃₀(r) mit falscher Orientierung des RRE₃₃₀-Fragmentes zeigte weder eine durch die RRE-Sequenz verursachte Depression der Luziferaseaktivität, wie bei pGL-RRE₃₃₀ beobachtet, noch eine Steigerung der Luziferaseaktivität bei Kotransfektion von Rev. Die Luziferase-Aktivitäten des *luc-gag*-Plasmides, sowie aller *luc-gag*-RRE-Plasmide mit verschieden langen RRE-Fragmente von 270 – 854 Basen, waren ohne Rev-Protein auf ca. 15-20 % im Vergleich zur gemessenen Aktivität der 100 % -Kontrolle (pGL-RRE₃₃₀) reduziert. Die mit dem Plasmid pGL-RRE₃₃₀-*gag* erzielte Steigerung der Luziferaseaktivität bei Kotransfektion von Rev war mit einem Faktor von 4 bis 5 in allen durchgeführten Tests am höchsten (Abb. 11). Weitere Sequenzabschnitte stromaufwärts oder stromabwärts dieses 330-Basen-Fragmentes, die in den längeren RRE-Fragmenten enthalten waren, zeigten in Verbindung mit dem *gag*-Sequenzbereich keine signifikante Verminderung der Luziferaseaktivität.

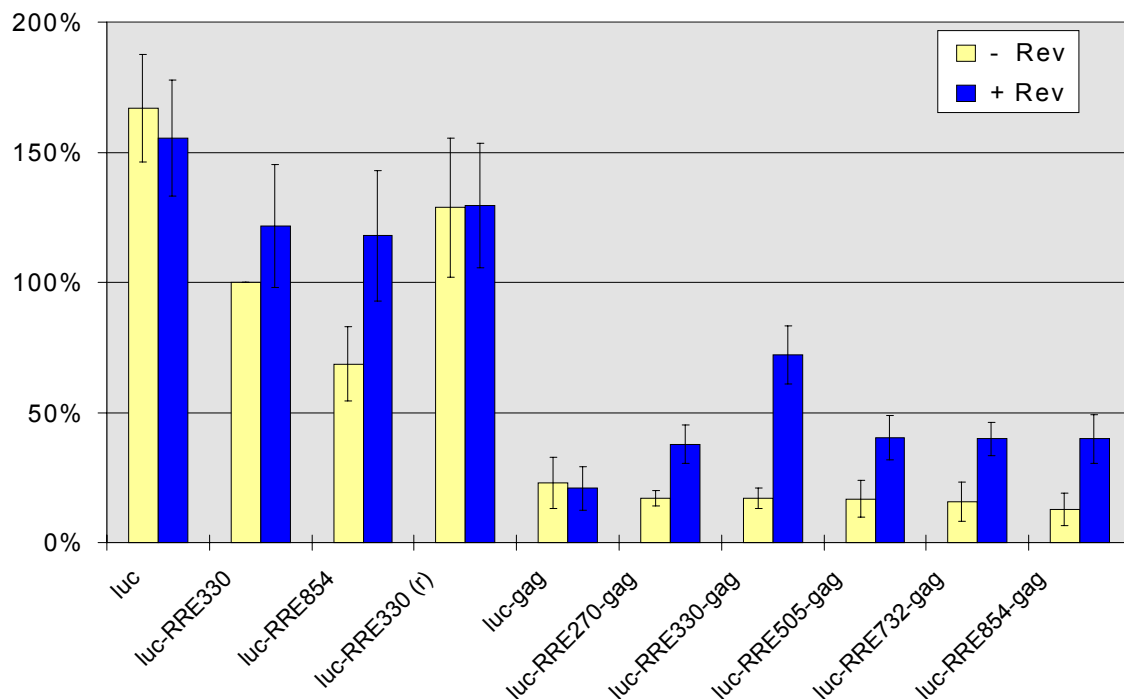


Abb. 11 Darstellung der Luziferaseaktivitäten, die von verschiedenen *luc*-RRE-*gag*-Konstrukten nach ihrer Transfektion in HeLa-Zellen bestimmt wurden. Unterschiedlich lange RRE-Fragmente (270-854 Basen) wurden eingesetzt. Die Luziferaseaktivität wurde ohne und mit Kotransfektion des Rev-Plasmides 48 h nach Transfektion in HeLa-Zellen bestimmt. Je Napf adherent wachsender HeLa-Zellen (12,5 cm²) wurden jeweils 10 µg *luc*-Plasmid sowie 2 µg Vektor ohne Rev-Insert, bzw. 2 µg Rev-Expressionsplasmid bei Rev-Koexpression transfiziert.

Die Steigerungen bei Kotransfektion von Rev fielen jedoch bei allen drei Konstrukten mit längeren RRE-Abschnitten geringer aus als bei pGL-RRE₃₃₀-*gag*. Ebenso verhielt es sich für die verkürzte RRE₂₇₀-Sequenz im Plasmid pGL-RRE₂₇₀-*gag*. Dies bedeutet, dass die Sequenzen des Fragments RRE₃₃₀ ausreichend sind, um in Gegenwart des Rev-Proteins den Export der Luziferasetranskripte zu vermitteln. Die zu erwartenden Änderungen der Reporteraktivitäten in Abhängigkeit von Rev-Protein waren hier am deutlichsten und das zur Verfügung stehende Messfenster für die Untersuchung regulatorischer Effekte daher am größten. Für weitere Expressionsexperimente wurde daher das Plasmid pGL-RRE₃₃₀-*gag* verwendet.

C.1.1.2.2. Bedeutung der Lokalisation des RRE

Die beiden Plasmide pGL-RRE₃₃₀-*gag* und pGL-*gag*-RRE₃₃₀, die sich lediglich in der Anordnung der beiden klonierten Sequenzen RRE und *gag* unterschieden (die daraus hervorgehenden mRNS-Transkripte sind in Abb. 12 dargestellt), wurden in mehreren unabhängigen Experimenten in HeLa-Zellen transfiziert, um die Luziferase-Aktivitäten und die

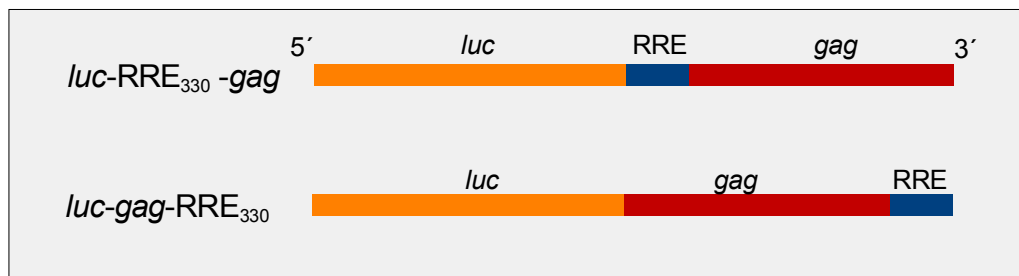


Abb. 12 Schematische Darstellung der mRNA-Sequenzfolge der Reporterplasmide *luc-RRE₃₃₀-gag* und *luc-gag-RRE₃₃₀*. Nur die Lokalisation der RRE-Sequenz ist unterschiedlich.

durch eine Kotransfektion von Rev induzierbaren Aktivitätssteigerungen zu vergleichen. Die erzielten Messwerte zeigten, wie in Abb. 11 für pGL-RRE₃₃₀-gag dargestellt, vergleichbar verringerte Luziferaseaktivitäten (ca. 15-20 %, im Vergleich zur Kontrolle pGL-RRE₃₃₀) unabhängig davon, ob die *gag*-Sequenzen direkt im Anschluss an das Luziferase-Gen oder stromabwärts nach den RRE-Sequenzen kloniert waren. In beiden Fällen lag die durch das Rev-Protein verursachte Steigerung der Luziferaseaktivität mit ca. 70-85 % etwa vier bis fünf mal höher im Vergleich zur nicht mit Rev kotransfizierten Kontrolle. Ein Einfluss der Lokalisation des RRE im Luziferase-Reporterplasmid auf die durch Rev erzielbare Steigerung der Luziferaseaktivität war daher nicht erkennbar.

C.1.1.2.3. Einfluss unterschiedlicher Teilsequenzen von HIV-1 gag

Das im Abschnitt C.1.1.2.1 vorgestellte Konstrukt pGL-RRE₃₃₀-gag erwies sich als am besten für Untersuchungen des Rev/RRE-abhängigen mRNA-Exports geeignet. Anstelle der gesamten *gag*-Sequenz wurden jeweils verschiedene Teilsequenzen von *gag* kloniert, die sich in ihrer Sequenz teilweise überlagerten (siehe C.3.1.1.2, Abb. 8). Verschiedene Sequenzbereiche von *gag* sollten auf diese Weise unabhängig voneinander untersucht werden. Anschließend wurden die daraus entstandenen Plasmide pGL-RRE₃₃₀-f1, pGL-RRE₃₃₀-f2, pGL-RRE₃₃₀-f3 sowie pGL-RRE₃₃₀-gag und das Kontrollplasmid pGL-RRE₃₃₀ in HeLa-Zellen transfiziert, um den Einfluss unterschiedlicher *gag*-Sequenzen auf den mRNA-Export der entsprechenden Fusions-mRNA-Konstrukte zu ermitteln. In Abb. 13 sind die verschiedenen mRNA-Transkripte zusammengefasst.

In den in Abb. 14 dargestellten Luziferase-Aktivitätsergebnissen ist eine Reduktion der Luziferase-Aktivität sowohl für pGL-RRE₃₃₀-gag, als auch für alle Konstrukte mit *gag*-Fragmenten im Vergleich zur Kontrolle pGL-RRE₃₃₀ zu beobachten.

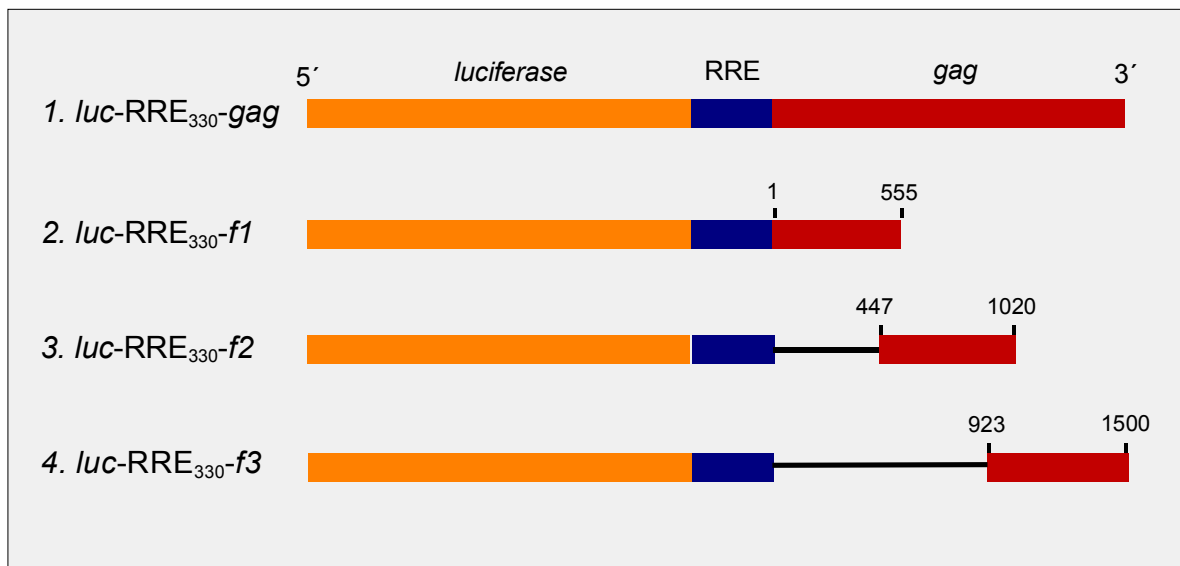


Abb. 13 mRNA-Transkripte der Luciferase-Reporterplasmide pGL-RRE₃₃₀-gag, pGL-RRE₃₃₀-f1 –f2 und –f3. Im Anschluss an das Stopkodon des Luciferasegens folgte das RRE₃₃₀-Fragment und unterschiedliche gag-Sequenzbereiche.

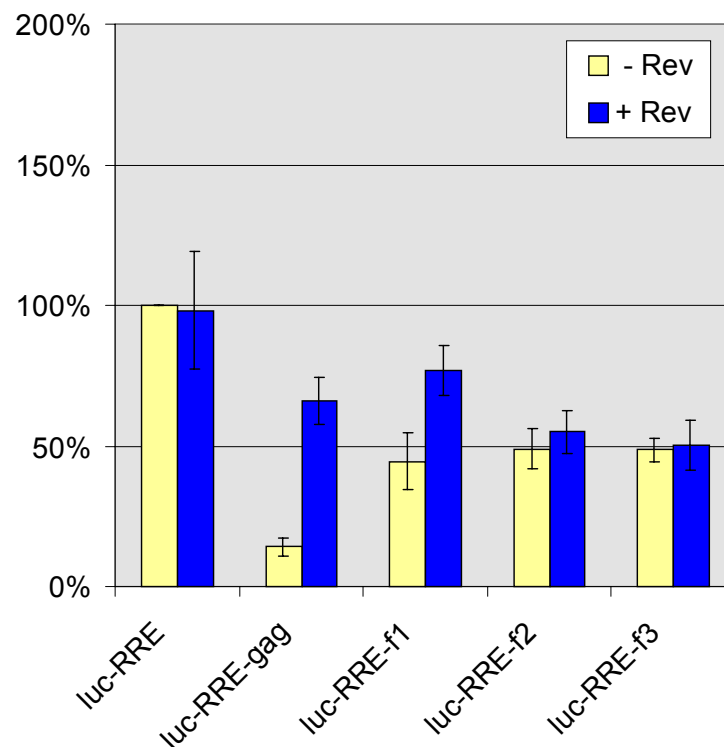


Abb. 14 Darstellung der Luciferaseaktivitäten nach Transfektion der Konstrukte *luc-RRE₃₃₀-gag* bzw. *gag*-Fragment-1, Fragment-2 und Fragment-3. Messung 48 h nach Transfektion in HeLa-Zellen ohne und mit Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmids. Je Napf adhärent wachsender Zellen wurden jeweils 10 µg *luc*-Plasmid sowie 2 µg Vektor ohne Rev-Insert, bzw. 2 µg Rev-Expressionsplasmid bei Kotransfektion von pcRev transfiziert.

Bei Verwendung der verschiedenen kürzeren *gag*-Sequenzfragmente fiel diese Reduktion deutlich geringer aus und betrug nur ca. 50 %. Bei pGL-RRE₃₃₀-*gag* betrug die Reporteraktivität in Übereinstimmung mit vorhergehenden Experimenten dagegen ca. 15 %. Diese durch die Präsenz von *gag*-Sequenzen verminderte Luziferaseaktivität konnte jedoch bei Kotransfektion von pcRev lediglich für pGL-RRE₃₃₀-*gag* und pGL-RRE₃₃₀-*fl* kompensiert werden. Die Luziferase-Werte waren für pGL-RRE₃₃₀-*gag* wiederum vier bis fünf mal höher, während sie sich für pGL-RRE₃₃₀-*fl* ungefähr verdoppelten. Die nach Transfektion der Plasmide pGL-RRE₃₃₀-*f2* und pGL-RRE₃₃₀-*f3* in HeLa-Zellen gemessenen Luziferaseaktivitäten konnten durch Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmids nicht gesteigert werden.

C.1.1.3. Immunhistochemischer Nachweis der *rev*-Expression in transfizierten HeLa-Zellen

Gleichzeitig mit den Luziferasetests wurde in den transfizierten Zellen das Rev-Protein mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf sterilen Objektträgern gezüchtet. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und nach Perforierung mit Tween20 mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rev-Protein inkubiert. Nach der sekundären Inkubation mit Texas-Rot gekoppelten Antikörpern konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche Färbung von Rev-exprimierenden Zellen beobachtet werden, während nicht mit dem Rev-Plasmid transfizierte Zellen dunkel erschienen (Abb. 15).

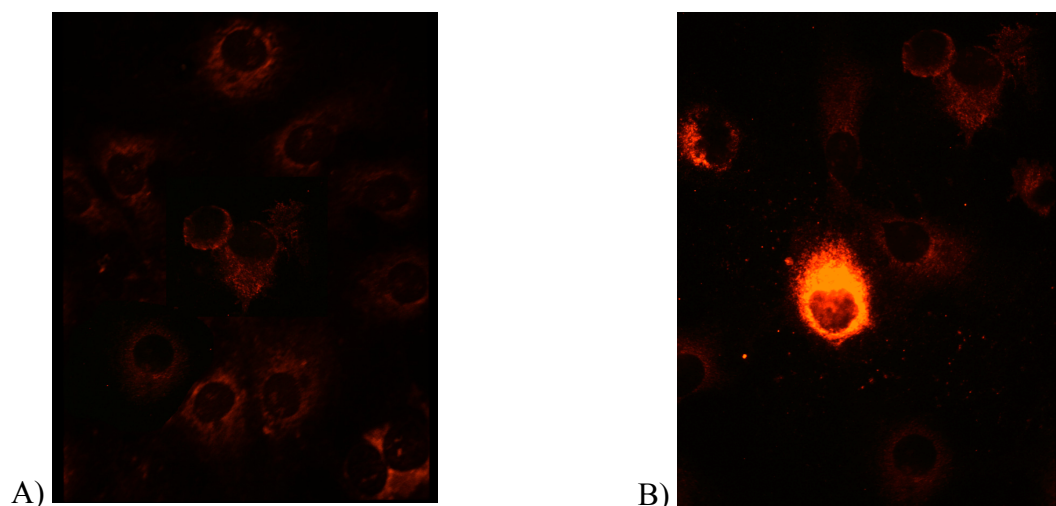


Abb. 15 Nachweis des Rev-Proteins in HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz. A) Negativkontrolle B) Rev-Protein exprimierende Zellen nach Transfektion des Plasmids pcDNA-Rev. Die mAK gegen Rev-Protein wurden mit einem mit Texas-Rot markierten Sekundärantikörper detektiert. (Vergrößerung 1:400).

Die Effizienz der Transfektion mittels Kalziumphosphat-Präzipitation betrug nur ca. 5-10 % der Zellen. Dennoch konnte die Expression von Rev-Protein klar nachgewiesen werden..

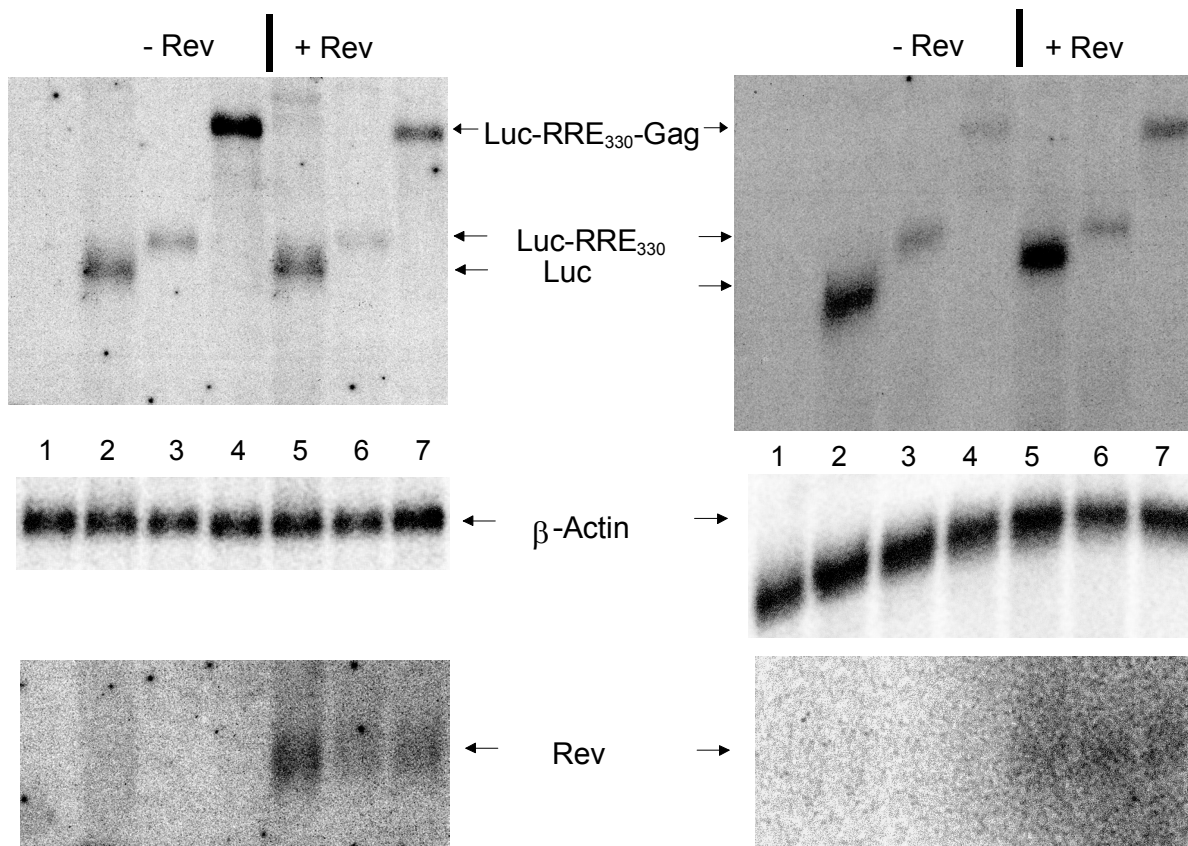
C.1.2. Northern-Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer mRNS Fraktionen transfizierter Zellen

Die unter C.1.1 dargestellten Ergebnisse geben Auskunft darüber, welche Sequenzbereiche von HIV-1 *gag* oder RRE die Aktivität des eingesetzten Luziferase-Reporters negativ beeinflussen, und dass dieser Einfluss durch RRE in *cis* und die Kotransfektion des Rev-Plasmids teilweise wieder aufgehoben werden kann. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *gag*-Sequenzen den Export der Reportertranskripte verhindern könnten. Jedoch wurde noch nicht gezeigt, dass veränderte Luziferaseaktivitäten durch einen veränderten mRNS-Export verursacht werden. Northern-Blot Analysen wurden durchgeführt, um diesen Beweis anhand der Untersuchung nukleärer und zytosolischer mRNS-Fraktionen zu liefern.

C.1.2.1. Charakterisierung der nukleären und zytoplasmatischen mRNS

Durch Isolierung und Analyse von mRNS aus den mit den Konstrukten pGL-control, pGL-RRE₃₃₀ oder pGL-RRE₃₃₀-*gag* transfizierten HeLa-Zellen, sowie einer nicht transfizierten Negativkontrolle wurde der Nachweis für die Aussagefähigkeit des etablierten Luziferase-Reportersystems erbracht. Hierzu wurde die Gesamt-RNS dieser Zellen präpariert und anschließend die mRNS isoliert. Gleiche Mengen der mRNS wurden in einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Mit verschiedenen radioaktiv markierten Sonden, die gegen die Sequenzen der Luziferase-mRNS, die Rev-mRNS, und die Aktin-mRNS als zelluläre Kontrolle gerichtet waren, wurden nacheinander die verschiedenen mRNS-Spezies auf dem Nylonfilter hybridisiert. Radioaktive Signale wurden mit Hilfe eines Phosphor-Imagers aufgezeichnet und anschließend auf Film belichtet. Die Ergebnisse dieser mRNS-Analysen sind in Abb. 16 dargestellt. Gleichzeitig zu den Northern-Blot Analysen wurde ein kleiner Teil der transfizierten HeLa-Zellen zur Quantifizierung der Luziferase-Aktivitäten eingesetzt. Die gemessenen Luziferasewerte stimmten mit den unter C.3.1.2, Abb. 11 dargestellten Ergebnissen überein und wurden hier nicht nochmals aufgeführt.

Die in Abb. 16 dargestellten radioaktiven Signale belegen die Aussagefähigkeit der bereits in den Luziferase-Reporter-Experimenten erzielten Ergebnisse. Die Transkription und der Export der mRNS des pGL*-c Kontrollplasmides bleibt von der gleichzeitigen Expression des Rev-Transporterproteins unbeeinflusst (Abb. 16a+b, Spuren 2+5).



a) nukleäre mRNS

b) zytoplasmatische mRNS

Abb. 16 Northern-Blot Analysen nukleärer (links) und zytoplasmatischer mRNS (rechts) aus den mit folgenden Konstrukten transfizierten HeLa-Zellen (v.l.n.r.): Spur 1. nicht transfizierte Negativkontrolle, Spur 2.+5. pGL*-c; Spur 3.+6. pGL-RRE₃₃₀; Spur 4.+7. pGL-RRE₃₃₀-gag; jeweils vor (-Rev), oder nach Kotretransfektion (+Rev) des Rev-Expressionsplasmides pcDNA-Rev. Probenmenge je Spur = 1,5 µg mRNS.

Während sich die mRNS von pGL-RRE₃₃₀-gag in Abwesenheit eines Rev-Transporterproteins im Zellkern stark anhäuft (Abb. 16a, Spur 4), befindet sich diese mRNS-Spezies in Gegenwart des Rev-Proteins überwiegend in der zytoplasmatischen mRNS-Fraktion (Abb. 16b, Spur 7). Der Export der mRNS nach Transfektion von pGL-RRE₃₃₀ blieb von dieser Rev-Regulation weitgehend unbeeinflusst (Abb. 16a; Spuren 3+6). Im Zytoplasma wurde für diese mRNS-Spezies kein quantitativer Unterschied in Abhängigkeit von Rev-Protein festgestellt (Abb. 16b, Spuren 3+6). Im quantitativen Vergleich der mRNS-Mengen, die von den Plasmiden pGL-RRE₃₃₀ (Abb. 16a, Spur 3) und pGL-RRE₃₃₀-gag (Abb. 16a, Spur 4) synthetisiert wurden, zeigte sich eine deutliche Retention der mRNS des *luc*-RRE-gag Fusionskonstruktes im Zellkern. Die spezifische Retention der *luc*-RRE-gag mRNS kann jedoch durch die Synthese von Rev-Protein zu einem großen Teil wieder aufgehoben werden. Insgesamt fällt auf, dass im

Vergleich zur mRNA des pGL*-c Kontrollplasmides (Abb. 16b, Spuren 2+5) bei Einsatz gleich hoher Mengen an Gesamt-mRNA im Northern-Blot die mRNA-Mengen der beiden untersuchten Konstrukte pGL-RRE₃₃₀ und pGL-RRE₃₃₀-gag im Zytoplasma auch in Gegenwart des Rev-Proteins deutlich geringer waren.

Die Ergebnisse des dargestellten Northern-Blots verdeutlichen ferner, dass die Transfektion der verschiedenen Luziferase-Reporterkonstrukte auch zu den unterschiedlichen transkribierten Fusions-mRNA Spezies der verschiedenen Längen führten (2300 Basen für pGL*-c, 2550 Basen für pGL-RRE₃₃₀ und 3850 Basen für pGL-RRE-gag). Die zusätzlich als interne Kontrolle dienende mRNA des β -Aktin-Gens mit ca. 1900 Basen verdeutlicht, dass gleiche Mengen Gesamt-mRNA für jede analysierte Probe eingesetzt wurden. Die Identifikation der Rev-mRNA (ca. 750 Basen) bei kotransfiziertem Rev-Expressionsplasmid ist ebenfalls gezeigt.

C.1.3. Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur Transkription und mRNA-Export von HIV-1 Sequenzabschnitten

Ein Luziferase-Reporter-Assay diente der Untersuchung des mRNA-Transports aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Um Einflüsse verschiedener HIV-Genombereiche auf den Export von mRNA zu untersuchen wurden die Nukleinsäuresequenzen in ein Luziferase-Reporterplasmid kloniert. Zur Messung der RRE-abhängigen Veränderung der Luziferaseaktivität wurden zusätzlich unterschiedlich lange RRE-Bereiche in das Reporterplasmid kloniert. Alle Luziferase-Reporterplasmide kodierten für identische Luziferase-Proteine, unter Verwendung unterschiedlich langer Transkripte. Minimale RRE-Fragmente von 330-Basen Länge genügten für die optimale Synthese der Luziferase. Eine Spleißakzeptorstelle im 854-Basen langen RRE-Fragment zeigte keinen Einfluss. Ferner wurde bei Kotransfektion von pc-Rev mit dem Konstrukt *luc*-RRE₃₃₀ die höchste Steigerung der Luziferaseaktivität erzielt. Daher wurde *luc*-RRE₃₃₀ als Ausgangsbasis für die Klonierung und Untersuchung von *gag*-Sequenzen im Reporteraktivitätstest eingesetzt. Alle drei klonierten *gag*-Fragmente reduzierten die Reporteraktivität nahezu gleich. Bei Verwendung von Fragment-1 (p17-Region von HIV-1 *gag*) konnte eine Steigerung durch Koexpression von Rev erzielt werden.

Zur Bestätigung der Aussagekraft der gewonnenen Daten und ihrer Korrelation mit der Regulation des mRNA-Exportes wurden Northern-Blot Analysen mit drei Luziferase-Konstrukten durchgeführt. Die Auswertung der Signale zeigte, dass in Gegenwart von *gag*-Sequenzen die entsprechende mRNA-Spezies (*luc*-RRE₃₃₀-*gag*) überwiegend im Zellkern gefunden, und nur bei Kotransfektion von pc-Rev ins Zytoplasma exportiert wurde. mRNA, die keine *gag*-Sequenzen enthielt blieb von dieser Rev-Regulation unbeeinflusst.

C.2. Einfluss von nicht translatierten Bereichen auf die Luziferase-Reporter-Aktivität

C.2.1.1. Untersuchung nicht kodierender HIV-Sequenzen im Luziferase-Reporterassay

Die in Abschnitt C.1 durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von *gag*-Sequenzen auf den Export von *luc*-RRE-*gag* mRNA dienten der Evaluierung des etablierten Testsystems. Die Reproduzierbarkeit und die Funktionalität konnte durch die gute Korrelation mit RNS-Analysen belegt werden. Dieser Test konnte daher für eine Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Rev-Protein vermittelte Proteinsynthese verwendet werden. Dazu wurden die oben beschriebenen Reporterkonstrukte um eine dem *gag*-Sequenzbereich vorgelagerte, 105 Basen lange, nicht translatierte Region (NTR) erweitert. Die Bedeutung der darin lokalisierten 5'-Spleißdonorstelle (SD) und des in der RRE-Region befindlichen Spleißakzeptor-Motivs (SA) für den Export der Reporter mRNA sollten auf diese Weise erfasst werden. Die beiden Fragmente RRE₃₃₀-NTR*gag* und RRE₈₅₄-NTR*gag* wurden zunächst, in Analogie zu dem in C.1.1.1.3 beschriebenen Klonierungsschema, in das Luziferase-Reporterplasmid kloniert. Bei diesen ersten beiden Plasmiden liegen die SD- und SA-Stellen in ihrer Reihenfolge vertauscht vor, da in den Luziferase-Expressionsplasmiden im Anschluss an die Luziferasesequenz zunächst die RRE-Fragmente folgen und erst danach die *gag*-Sequenz. Danach wurden zwei weitere Reporterplasmide mit richtiger Anordnung von SD und SA hergestellt, um die Bedeutung von möglichen Spleißereignissen zu erfassen. Die Klonierungsfragmente NTR*gag*-RRE₃₃₀ und NTR*gag*-RRE₈₅₄ stammen aus Gag-Expressionsplasmiden, auf die in Abschnitt C.3 näher eingegangen wird. In Abb. 18 sind die verschiedenen aus den Plasmidkonstrukten hervorgehenden Luziferase-Transkripte gegenübergestellt. Eine Übersicht zu den hergestellten Plasmiden und ihrem Verwendungszweck ist in Tab. 1, Kapitel B.1.3.4 gegeben. Die Ergebnisse der Reporteraktivitäten dieser beiden Konstrukte sollten Aussagen zur Bedeutung von Spleißstellen im Reportertest ermöglichen.

C.2.1.2. Klonierung der Luziferase-NTR*gag*-RRE Reporterkonstrukte

Zunächst wurde die NTR*gag*-Sequenz mittels PCR unter Verwendung der Primer *gag*5's.j.6-1f und *gag*5-6r (Kap. B, Tab. 2) aus dem Plasmid pc-NTR*gag* amplifiziert und über *Eco*RI in die Luziferase-Plasmide pGL-RRE₃₃₀ und pGL-RRE₈₅₄ (siehe C.1.1.2) ligiert. Die entstandenen Plasmide wurden pGL-RRE₃₃₀-NTR*gag* und pGL-RRE₈₅₄-NTR*gag* genannt (Abb. 18, 2. u. 3.). Letzteres enthält den SD und SA in falscher Reihenfolge.

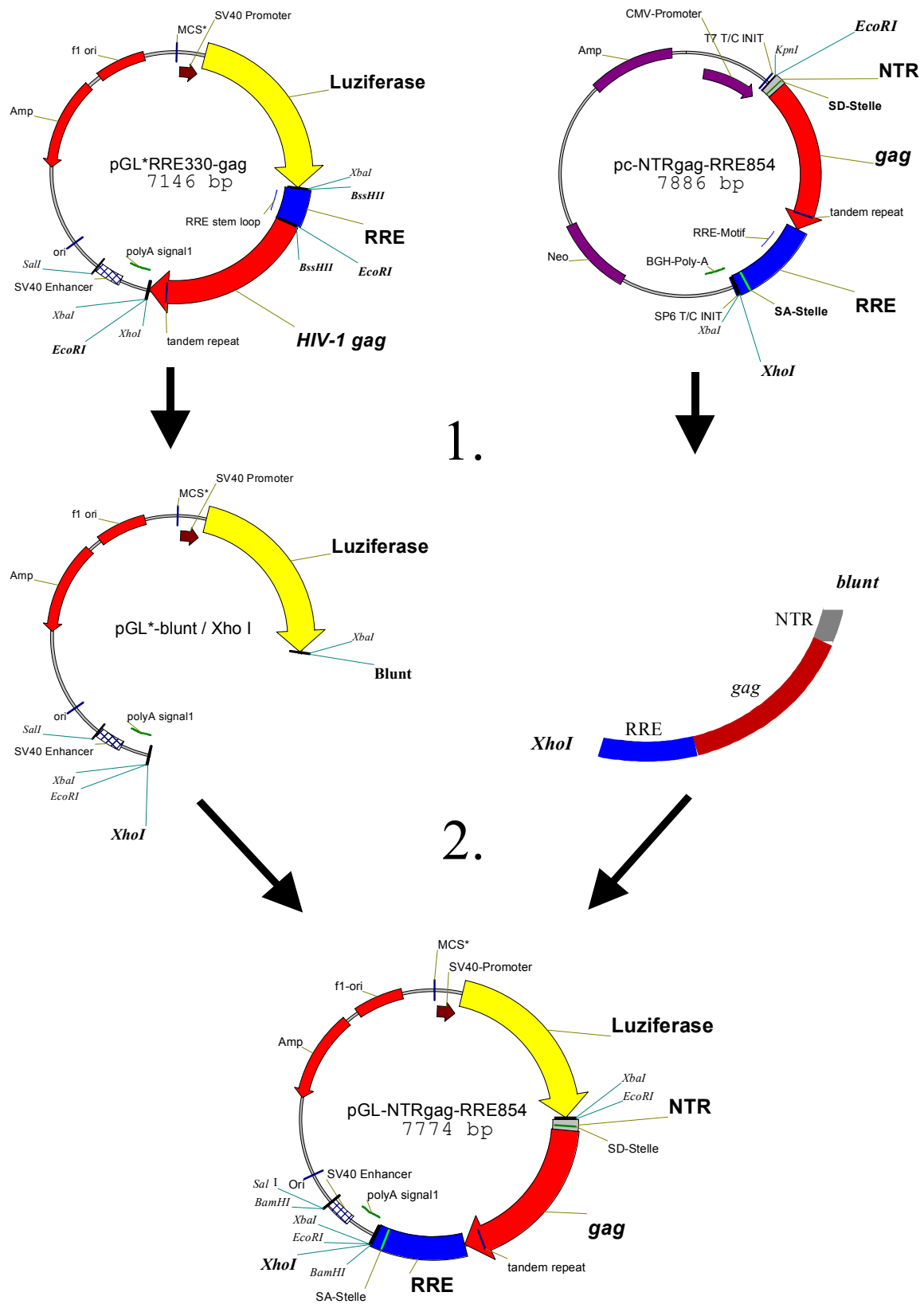


Abb. 17 Umklonierung von NTRgag-RRE-Sequenzen aus einem Gag-Expressionsplasmid in das Luciferase-Reporterplasmid. Das Klonierungsschema zeigt den schrittweisen Vorgang der Klonierungen am Beispiel der eingefügten Sequenz NTRgag-RRE₈₅₄

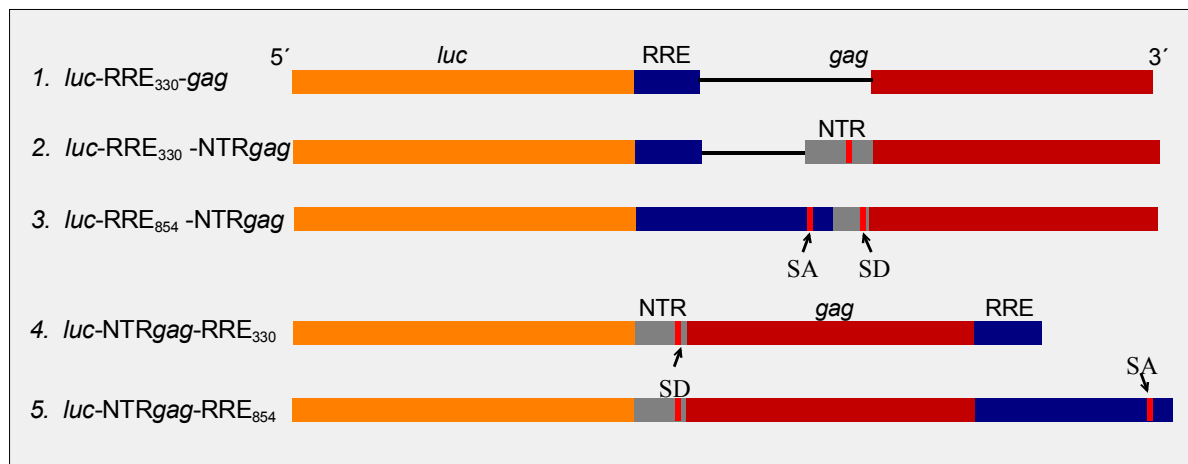


Abb. 18 mRNA-Transkripte von Luciferase-Reporterplasmiden zur Untersuchung der Bedeutung von HIV-NTR und Spleißstellen. NTR=nicht translatierter Bereich, SD=Spleißdonor, SA= Spleißakzeptor. Alle Transkripte kodieren für den Luciferase-Reporter, jedoch enthalten die verschiedenen mRNA unterschiedliche zusätzliche Sequenzen stromabwärts des *luc*-Stopkodons.

Weiterhin wurden die beiden Fragmente NTR*gag*-RRE₃₃₀ und NTR*gag*-RRE₈₅₄ aus Gag-Expressionsplasmiden (siehe C.3.) in das Luciferase-Reporterplasmid umkloniert (Abb. 17). Nach dem Aufschneiden der Plasmide pGL-RRE₃₃₀-*gag* mit *Bss*HII und der beiden pc-NTR*gag*-Plasmide mit *Eco*RI wurden die Schnittstellen mittels Klenow-Reaktion zu glatten Enden aufgefüllt. Anschließend wurden die Plasmide pGL-RRE₃₃₀-*gag* bzw. pc-NTR*gag*-RRE mit *Xho*I geschnitten (Abb. 17-1). Die Fragmente NTR*gag*-RRE₃₃₀ bzw. -RRE₈₅₄ wurden dann in das Plasmid pGL*blunt/*Xho*I ligiert. Es entstanden die Plasmide pGL-NTR*gag*-RRE₃₃₀ und pGL-NTR*gag*-RRE₈₅₄ (Abb. 17-2 und Abb. 18, 3. u. 4.). Die aus diesen verschiedenen Luciferase-Reporterplasmiden entstehenden mRNA-Transkripte sind zur Übersicht in Abb. 18 zusammengefasst.

C.2.1.3. Transfektionen in HeLa-Zellen

Die in C.2 beschriebenen Reporterkonstrukte wurden für vergleichende Studien in HeLa-Zellen eingebracht. Betrachtet man die Luciferaseaktivitäten in Zellen, die mit Plasmiden mit NTR-Region transfiziert wurden, so fällt auf, dass bereits ohne Kotransfektion von Rev die Menge des Reporterproteins ca. doppelt so hoch war wie nach Transfektion der Konstrukte ohne NTR (Abb. 19, vgl. Balken 2 und 3). Diese Steigerung war unbeeinflusst von der Länge der RRE-Sequenz (Abb. 19, vgl. Balken 3 und 4) und von der Lokalisation des NTR (Abb. 19, vgl. Balken 3 und 5). In allen Fällen war eine vergleichbare Steigerung der Luciferaseaktivitäten um das 4 bis 5-fache zu sehen, wenn gleichzeitig Rev-Protein produziert wurde. Die Luciferaseaktivität

nach Transfektion des Kontrollplasmids pGL-RRE₃₃₀ wurde, wie schon in früheren Reporterexperimenten beobachtet, in Gegenwart von Rev-Protein leicht gesteigert. Die Luziferase-Aktivitäten des zum Vergleich nochmals mittransfizierten Plasmids pGL-RRE_{330-gag} stimmten gut mit den bereits in C.1.1.2 ermittelten Daten überein.

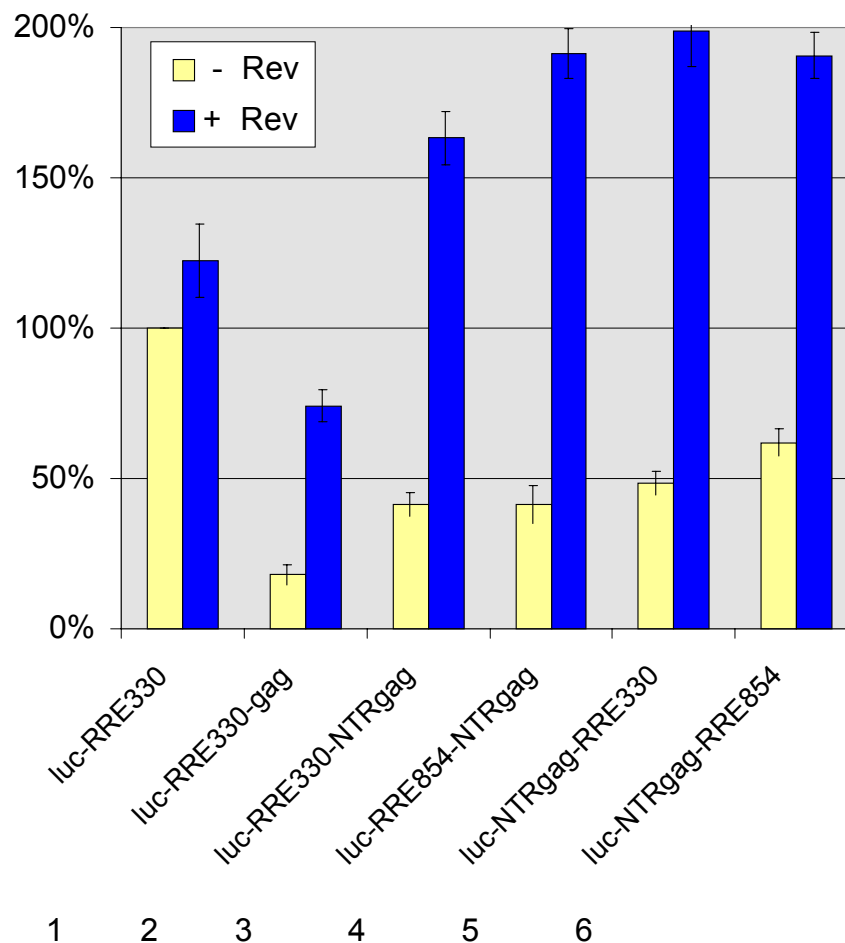


Abb. 19 Balkendiagramm der Luziferase-Reporterstudien zur Bedeutung der HIV-NTR-Sequenz und der verwendeten Spleißstellen für den Export der *luc*-Fusions-mRNS. v.l.n.r. (1) *luc*-RRE₃₃₀; (2) *luc*-RRE_{330-gag}; (3) *luc*-RRE_{330-NTRgag}; (4) *luc*-RRE_{854-NTRgag}; (5) *luc*-NTRgag-RRE₃₃₀; (6) *luc*-NTRgag-RRE₈₅₄.

Im Gegensatz zum NTR (Abb. 19, vgl. Balken 2 mit 3, 4, 5 und 6) beeinflusste die längere RRE₈₅₄-Sequenz mit einer darin enthaltenen SA-Stelle die Reporteraktivität nicht (Abb. 19, vgl. Balken 4 mit 3 und 5). In richtiger Orientierung von Spleißdonor im NTR und Spleißakzeptor im RRE₈₅₄ war dagegen eine zusätzliche Steigerung von etwa 20% zu beobachten (Abb. 19, vgl. Balken 5 und 6). Alle transfizierten Konstrukte erzielten unter Einfluss von Rev eine deutlich gesteigerte Luziferaseaktivität. Dies war auch für das Konstrukt *luc*-NTRgag-RRE₈₅₄ zu

beobachten. Hier würde man aber erwarten, dass bei funktionell aktiven Spleißstellen der Bereich *gag*-RRE₈₅₄ entfernt und somit eine Rev-abhängige Steigerung der Luziferaseaktivität verloren ginge. Dies bedeutet, dass Spleißvorgänge nur eine untergeordnete Rolle spielen, jedoch der nicht translatierte Bereich erheblich zur Stabilisierung der Reporter-mRNS beiträgt oder die Translation positiv beeinflussen kann.

C.2.2. Kurzzusammenfassung zur Bedeutung von Spleißstellen auf die Expression des Luziferase-Reporters

Eine NTR-Sequenz wurde in verschiedene Luziferase-Reporterkonstrukte kloniert. Diese NTR liegt im HIV-Genom stromaufwärts des *gag*-Startkodons. Zwei Plasmide mit unterschiedlichen RRE-Sequenzabschnitten enthielten die eingefügte NTR-Sequenz in der Reihenfolge NTR*gag*-RRE, die beiden anderen Plasmide in der Reihenfolge RRE-NTR*gag*. In zwei Plasmiden waren SD- und SA-Motiv vertauscht. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente zeigten einen positiven Einfluss der im NTR-Bereich lokalisierten SD-Stelle auf die Rev-unabhängige Luziferasesynthese. Die im RRE₈₅₄ liegende SA-Stelle konnte in richtigem Kontext von SD und SA diesen Effekt weiter verstärken. Die durch Kotransfektion von pc-Rev erzielbare Aktivitätssteigerung betrug bei allen untersuchten Reporterplasmiden ungefähr das 4-5 fache der Aktivitäten ohne den Einfluss von Rev-Protein. Obwohl im Plasmid pGL-NTR*gag*-RRE₈₅₄ eine SD-Stelle im NTR-Bereich und eine SA-Stelle im RRE-Bereich vorhanden waren blieb die Rev-abhängige Steigerung der Luziferaseaktivität erhalten.

C.3. Etablierung von B-Zelllinien zur Expression von HIV-1 Gag-Proteinfragmenten

Die Analyse der verschiedenen *gag*-Konstrukte im Reportertest haben gezeigt, dass der Spleißdonor und der Spleißakzeptor keinen regulierenden Einfluss auf die Expressionsrate des Reportergens haben. Die Produktion von Gag-Protein in eukaryotischen Zellen sollte daher ebenfalls nicht durch diese Motive beeinflusst werden. Da auf Grund von klonierungsbedingten Voraussetzungen die stromaufwärts des *gag*-Gens gelegene nicht translatierte Region (NTR) bei Subklonierungen mit übertragen worden war, konnten ein möglicher regulierender Einfluss auf die Gag-Expression nicht experimentell hinterfragt werden. Um einem potentiellen Mechanismus nachzugehen, wurde das *gag*-Gen in dieser Arbeit erstmals exakt, als komplettes Gen und zusätzlich in Teilfragmenten kloniert und für Expressionsstudien verwendet.

C.3.1. Klonierung und Charakterisierung von HIV-1 Gag Expressionsplasmiden

Drei miteinander überlappende Fragmente des Gag-Leserahmens, die weitgehend die drei Bereiche des p17 Matrixproteins (Basen 1-545), des p24 Kapsidproteins (Basen 449-997) und des p15 Nukleokapsidproteins (Basen 937-1539) repräsentieren, sowie der gesamte *gag*-Leserahmen (Basen 1-1539) wurden mittels PCR aus dem Konstrukt HIV-1_{HX10} (Ratner *et al.*, 1987) mit den Primern 2.1.2f bis 2.6r amplifiziert (Tab. 2, Kapitel B) und zunächst in den Klonierungsvektor pTA ligiert. Die im Expressionsvektor zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen *NheI* am 5'-Terminus und *XhoI* am 3'-Terminus der multiplen Klonierungsstelle (MCS) eigneten sich nicht für die direkte Klonierung der amplifizierten Fragmente in den Expressionsvektor pRep-8, da *NheI* und *XhoI* Schnittstellen nahe am Ende einer Nukleinsäuresequenz nicht vollständig geschnitten wurden. Durch die Zwischenklonierung der *gag*-Sequenzen in den pTA-Klonierungsvektor und Subklonierung in die MCS des Vektors pRep8, wurde dieses Problem gelöst. Die Expressionsklone pRep-*f1*, pRep-*f2*, pRep-*f3* mit einer jeweiligen Größe von ca. 12,4 kb und pRep-*gag* mit 13,3 kb Länge konnten mit Hilfe dieser Schritte hergestellt werden. Eine Übersicht über alle hergestellten pRep-Plasmide und ihren Verwendungszweck ist in Tab. 1, Kapitel B dargestellt. In Abb. 20 sind die durch Restriktionsanalysen entstehenden DNS-Fragmente im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel dargestellt. Abb. 21 fasst das Klonierungsschema noch einmal zusammen.

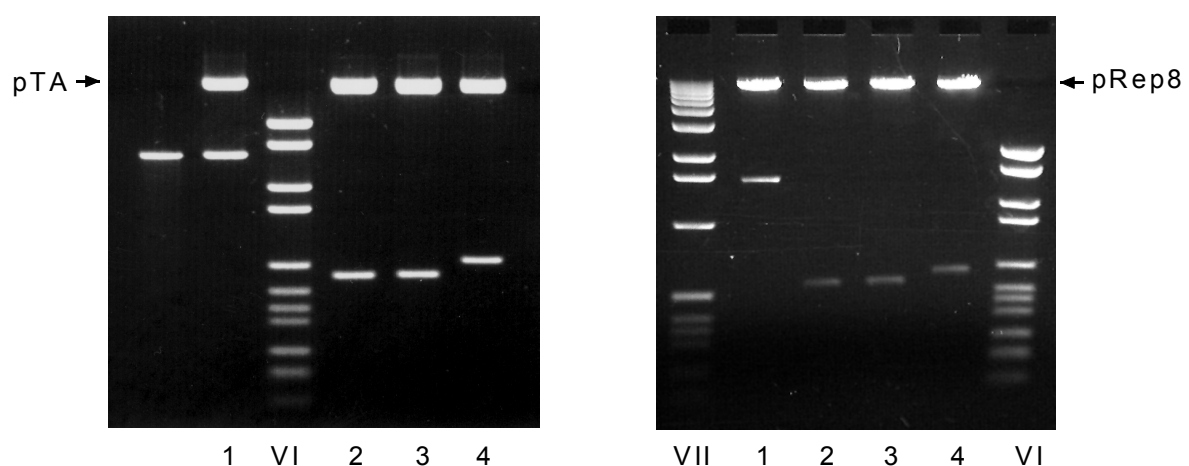


Abb. 20 Restriktionsenzym-Analysen der Klonierungen in den Zwischenklonierungsvektor pTA sowie nach der Subklonierung in pRep8. 1. komplette *gag*-Gensequenz; 2. Fragment 1; 3. Fragment 2; 4. Fragment 3; Molekulargewichtsstandards VI und VII (BM)

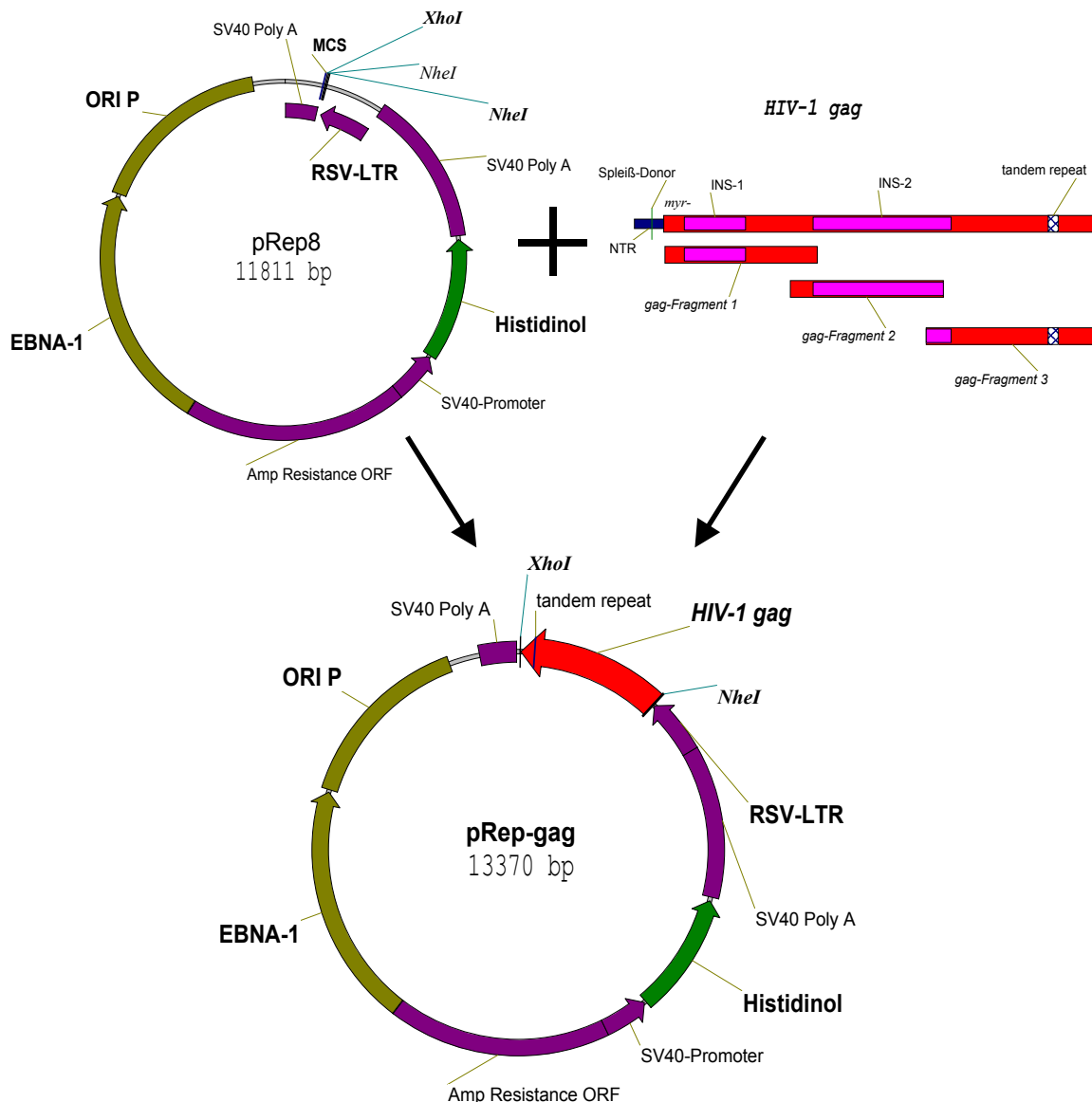


Abb. 21 Klonierung von HIV-1 *gag* bzw. Teilsequenzen von *gag* in den eukaryotischen Expressionsvektor pRep8 (Genom-Gesamtübersicht siehe Kapitel A, Abb. 1). Alternativ zu *gag* wurde jeweils eines der miteinander überlappenden Fragmente von *gag-f1*, *-f2* oder *-f3* kloniert (zusätzliche Plasmide nicht gezeigt).

Die vollständige Sequenzierung aller klonierten *gag*-Fragmente und des kompletten *gag*-Leserahmens mit den Sequenzierprimern (B bis E, und S1, S2, siehe Tab. 2, Kapitel B) in beide Richtungen ergab, dass alle eingefügten Sequenzen frei von Mutationen waren. Das *gag*-Gen, sowie das *gag-f1*-Fragment enthielten das natürliche Startkodon sowie die durch den Primer 2.1.2 eingebrachte Mutation der zweiten Aminosäure von Glycin nach Alanin. Diese wurde

eingeführt, um eine Myristylierung der Proteine und damit ihren Transport zur Zellmembran zu verhindern.

Die Fragmente *gag-f2* und *-f3* wurden durch die Primer 2.3 und 2.5 jeweils mit einem nicht in der Originalsequenz vorkommenden Startkodon, die Fragmente *gag-f1* und *-f2* durch die Primer 2.2 und 2.4 jeweils mit einem Stopkodon versehen, um ihre Expression im Vektor pRep8 zu ermöglichen. Ferner wurde durch Sequenzierung der im Konstrukt HIV-1_{HX10} vorkommende 36 Basen lange Tandem-Repeat im Bereich von 2166 bis 2201 des *gag-f3* Fragmentes identifiziert, mit der sich unter anderem die Sequenz des Stammes HIV-1 HX10 von dem Stamm HIV-1 HXB2 unterscheidet (Ratner et al, 1987). Analog zur oben beschriebenen Klonierung wurde die HIV-1 *gag-Sequenz* sowie drei *gag*-Fragmente über die singulären Schnittstellen *SpeI* (*XhoI* kompatibel) und *NheI* in den Vektor pBK_{RSV} umkloniert, um ihre Expression zusätzlich in einem anderen eukaryotischen Expressionsvektor zu überprüfen.

C.3.2. Bakterielle Expression der HIV-1 *gag*-Gensequenzen

Um zu untersuchen, ob die bakterielle Expression von Gag-Protein und der drei Teilsequenzen *gag-F1*, *-F2* und *-F3*, gelingt, wurden die Expressionsplasmide pBK-*Gag*, pBK-*F1*, pBK-*F2* und pBK-*F3* in den *E.coli* Stamm *JM109* transfiziert. Eine Übersicht der hergestellten Plasmide und ihr Verwendungszweck ist in Tab. 1, Kapitel B dargestellt. Der Bakterienstamm *JM109* überexprimiert konstitutiv den Lac-Z Repressor und kann durch Behandlung mit 2 mM IPTG zur Expression der *gag*-Sequenzen induziert werden. In den untersuchten Bakterienzellsaten ergaben sich im Western-Blot unter Verwendung der monoklonalen Antikörper (mAK) Gag-13/5 und Gag-16/4/2 deutliche Proteinbanden für Gag-Protein (Abb. 22, Spur 8), sowie die Proteinfragmente F1 und F2 (Abb. 22, Spuren 2 + 4). Da die mAK-Bindungsstellen im Übergangsbereich von Gag-p17 und -p24 liegen wurde das Proteinfragment Gag-F1 nicht so gut erkannt wie das Proteinfragment Gag-F2. Das Proteinfragment Gag-F3 ließ sich dagegen nicht identifizieren, da die verwendeten mAK diesen Proteinbereich nicht spezifisch erkannten. Auch Humansenen HIV-1 positiver Patienten reagierten nicht mit dem Proteinfragment Gag-F3. Es ist aber davon auszugehen, dass auch dieser Proteinbereich bakteriell exprimiert wurde und nur aufgrund fehlender dominanter Epitope keine menschlichen Antikörper gebildet werden. In den Spuren 1, 3, 5 und 7 wurden Bakterienlysate vor Induktion mit IPTG aufgetragen. Die Spuren 2, 4, 6 und 8 enthalten Bakterienlysate nach Induktion mit IPTG.

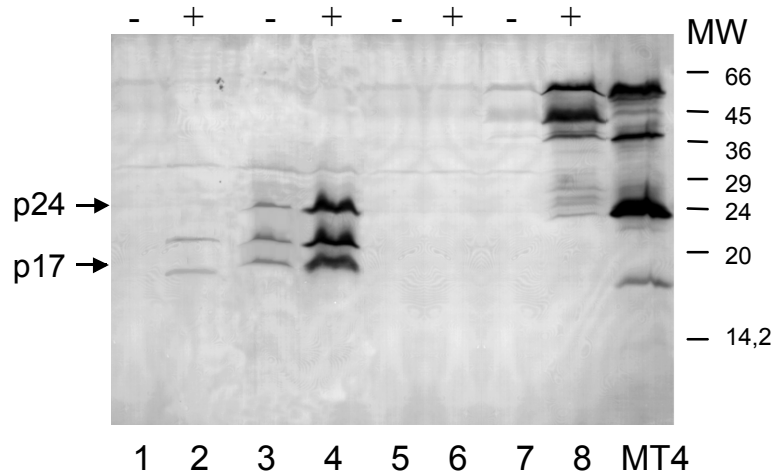


Abb. 22 Western-Blot zum Nachweis der Expression von HIV-1 Gag-Protein und Proteinteilsequenzen in *E.coli* JM109. Bakterienlysate vor (-) und nach (+) Induktion der Bakterien mit IPTG wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1+2 Gag-Fragment-1; Spur 3+4 Gag-Fragment-2; Spur 5+6 Gag-Fragment-3; Spur 7+8 Gag; Spur 9 HIV-1 MT4 Positivkontrolle; Spur 10 Proteinmarker (kD). Es wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen.

C.3.3. Expression der *gag*-Gensequenzen in eukaryotischen Zellen

Nachdem die *gag*-Sequenzen in den Expressionsplasmiden überprüft waren und ihre bakterielle Expression erfolgreich verlief, sollten diese Sequenzen nun in eukaryotischen Zellen zur Expression gebracht werden. Hierfür wurden immortalisierte B-Zellen HIV-1 infizierter Patienten verwendet, die als Grundlage für die Expression von *gag*-Sequenzen und der anschließenden Präsentation von B-Zell-Epitopen dienten. Der EBV-abgeleitete Vektor pRep-8 lieferte die dafür notwendigen Voraussetzungen und enthält ausserdem Merkmale, die eine unerwünschte chromosomale Integration der *gag*-Sequenz verhindern.

C.3.3.1. Transfektion von B-Zellen

Die oben beschriebenen Expressionsplasmide pRep-*gag*, pRep-*fl*, pRep-*f2* und pRep-*f3* wurden mittels Elektroporation in B-Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von Histidinol zur Expression des Histidinol-Resistenzgens angeregt und konnten, wie in Abb. 23A dargestellt, nach mehreren Zellwachstumspassagen angereichert werden. Unter dem Selektionsdruck verschieden hoher Konzentrationen von Histidinol im Kulturmedium wurden die Wachstumsbedingungen transfizierter und nicht transfizierter B-Zellen in mehreren Transfektionsexperimenten ermittelt. Als Reporter wurde SEAP (siehe Kapitel B.1.3.3) in den gleichen Expressionsvektor pRep-8 kloniert, um die Expression des Reportergens unter der Kontrolle des gleichen Promoters zu halten wie die der *gag*-Sequenzen. Die Synthese der

Alkalische Phosphatase (AP) wurde mit Hilfe der Lumineszenz-Messung ermittelt. Die Entwicklung der Lumineszenz ist mit der Zellteilungsrate gleichzusetzen. Eine reduzierte Teilungsrate nicht transfizierter B-Zellen ergab sich bereits bei einer Konzentration von 1 μM Histidinol, während transfizierte B-Zellen erst ab einer Konzentration größer 3 μM Histidinol schlechter replizierten.

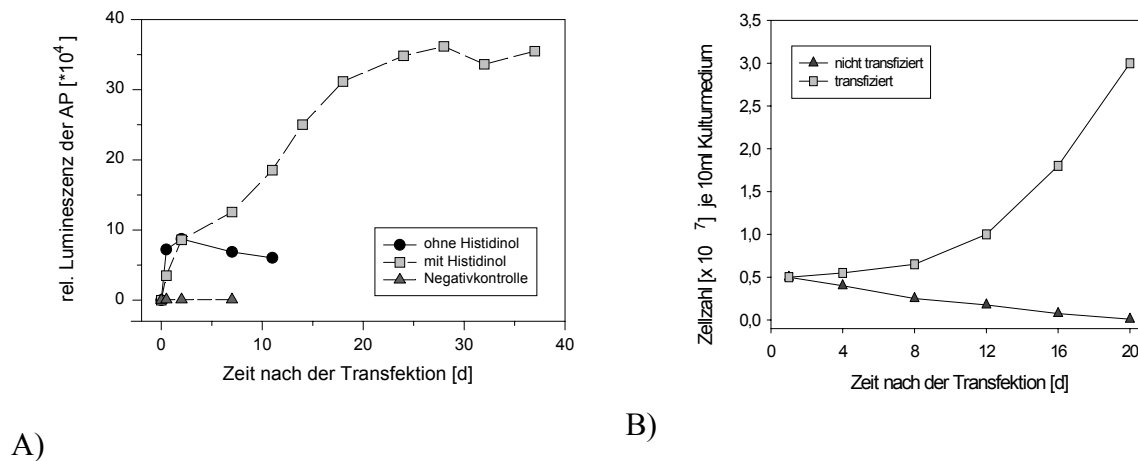


Abb. 23 Selektion transfizierter B-Zellen unter dem Selektionsdruck von Histidinol. A) Verlauf des Zellwachstums von mit pcmv-SEAP transfizierten B-Zellen in Kulturmedium ohne und mit Histidinol als Selektionsmarker. B) Wachstumskurve transfizierter und nicht transfizierter B-Zellen in Resistenzmedium

Die Abbildung 23A zeigt den deutlichen Wachstumsvorteil der transfizierten B-Zellen im Resistenzmedium, das 2,5 μM Histidinol enthielt. Die Expression des pRep-SEAP Reporterplasmides stieg bis zum 25. Tag nach der Transfektion deutlich an und blieb danach konstant. Die transiente AP-Expression ohne Zugabe von Resistenzmedium war zwei Tage nach der Transfektion am höchsten und viel dannach wieder ab. Bei einer Konzentration von 2,5 μM Histidinol waren bereits nach zwei Wochen alle nicht transfizierten Zellen abgestorben, während sich die pRep-SEAP transfizierten Zellen nach ca. einer Woche wieder logarithmisch weiter vermehrten (Abb. 23B). Ab dem 2. Tag nach der Transfektion, sowie mehrfach in einem Zeitraum von drei Monaten wurden Zellen aus den Kulturen entnommen und mittels HIV-1 p24-Antigen-ELISA, Western-Blot und Immun-Fluoreszenz auf die Gag-Proteinsynthese untersucht. Für den Nachweis des Proteins im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz wurden monoklonale Antikörper oder Seren HIV-infizierter Patienten verwendet. Als Positivkontrollen dienten HIV-1 infizierte MT4-Zellen. Wie in Abb. 24 dargestellt konnten weder mit

monoklonalen Antikörpern mAK Gag-16/4/2 und mAK Gag-13/5 (Abb. 24 A), noch mit Humanseren (Abb. 24 B) im Western-Blot spezifische Proteinbanden identifiziert werden. Histochemische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz und vergleichsweise sensitive p24-ELISA konnten die Gag-Proteinsynthese ebenfalls nicht bestätigen. Gag-Protein wurde in allen Nachweismethoden nur bei infizierten MT4-Zell nachgewiesen, die als Positivkontrolle dienten.

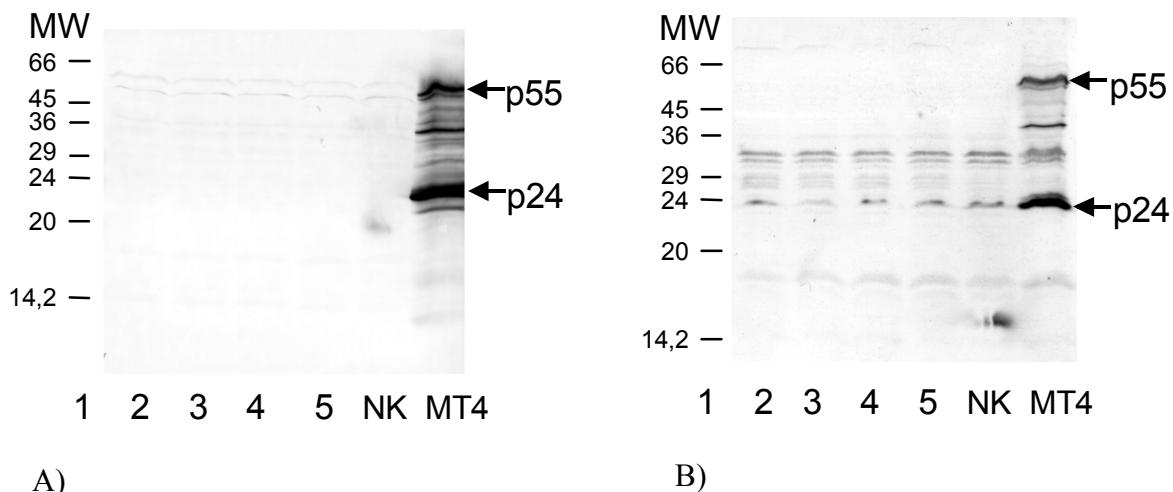


Abb. 24 Western-Blot zum Nachweis von HIV-1 Gag-Protein. Zell-Lysate transfizierter B-Zellen (je 10 µg Gesamtprotein) wurden mit Humanseren HIV-1 positiver Patienten (A) oder mit den mAK 13/5 + 16/4/2 (B) inkubiert. Spur 1. Molekulargewichtsstandard; Spur 2. pRep-F1; Spur 3. pRep-F2; Spur 4. pRep-F3; Spur 5. pRep-gag. NK=pRep8.

C.3.3.2. Transfektion von HeLa-Zellen

Die oben beschriebenen Nachweisverfahren wurden auch mit adherent wachsenden HeLa Zellen wiederholt, da unklar war, ob der Einsatz von Suspensionszellen in Verbindung mit der Elektroporation als Transfektionsmethode ausreichend effizient war, um Gag-Proteinsynthese nachweisen zu können. HeLa-Zellen wachsen deutlich schneller als B-Zellen und lassen sich effizient durch die Kalziumphosphat-Präzipitation von DNS transfizieren. Auch bei dieser Zelllinie konnten mit keiner der angewandten Methoden Gag-Protein nachgewiesen werden.

C.3.3.3. Northern-Blot Analyse zum Nachweis von HIV-1 *gag*-Transkripten

Der Nachweis von Gag-Proteinfragmenten in transfizierten B-Zellen oder transient transfizierten HeLa-Zellen war nicht möglich. Das kann auf eine mangelhafte Transfektionsrate oder eine ineffiziente Translation zurückzuführen sein. Um die erste dieser Möglichkeiten zu hinterfragen,

wurde aus je 10^8 Zellen der transfizierten B-Zellkulturen die RNS isoliert und im CsCl_2 -Dichtegradienten gereinigt. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNS von mit HIV-1 infizierten MT4-Zellen eingesetzt. Für Northern-Blot Analysen wurde sowohl die Gesamt-RNS als auch die daraus isolierte mRNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Sonde wurde *gag*-kodierende DNS aus pRep-*gag* unter Einsatz von Zufallsprimern und radioaktivem P^{32} dCTP markiert. Wie in Abb. 25A und 25B gezeigt, konnten in keiner der isolierten RNS-Fractionen mit Ausnahme der Positivkontrolle *gag*-spezifische RNS-Transkripte nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der Aktivität des RSV-Promotors in den verwendeten Zellen wurden in einem weiteren Experiment i) das oben beschriebene pcmv-SEAP-Expressionsplasmid, ii) zwei weitere SEAP-Expressionsplasmide mit RSV-Promotor pRep-SEAP und pBK_{RSV}-SEAP und iii) die oben beschriebenen pBK-Konstrukte pBK-*Gag*, pBK-*F1*, pBK-*F2* und pBK-*F3* in B-Zellen transfiziert, um nach Vermehrung dieser Zellen die RNS zu isolieren. Die Northern-Blot Analyse dieser RNS und die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten SEAP-DNS Sonde war für alle drei eingesetzten SEAP-Plasmide erfolgreich (Abb. 26, Spur 1,2 und 3).

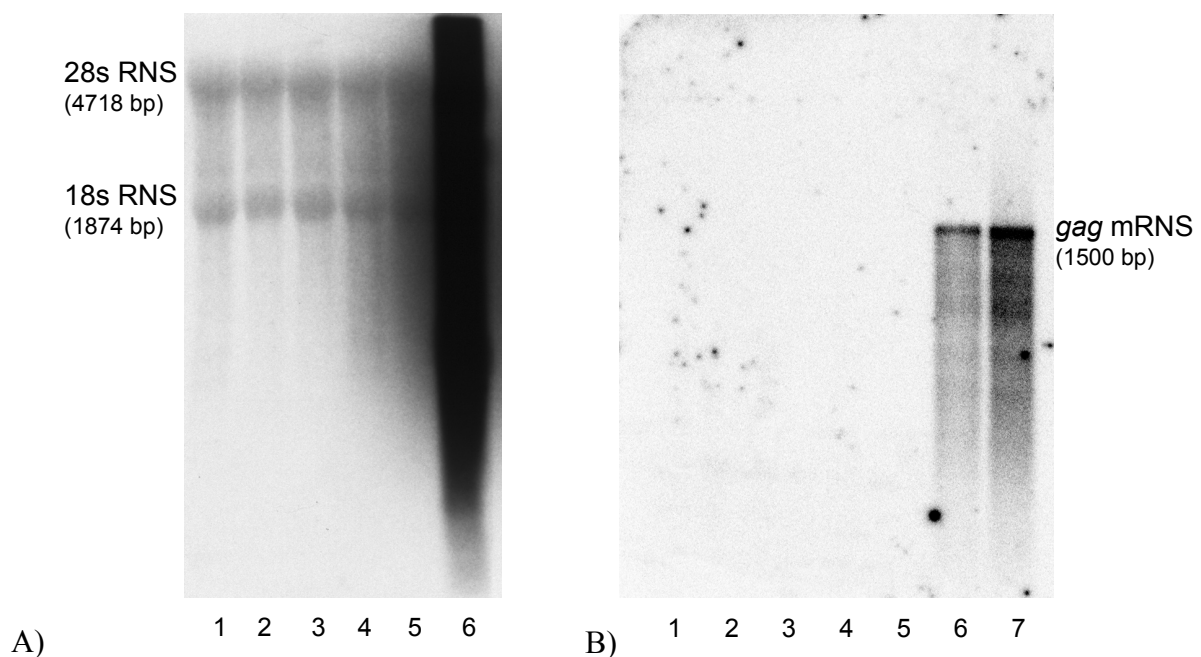


Abb. 25 Northern-Blot Analyse zum Nachweis von *gag*-spezifischen Transkripten. Eingesetzt wurden je 20 μg Gesamt-RNS (A), bzw. 2 μg angereicherter mRNA (B). RNS aus B-Zellen, die mit pRep-*gag* und den *gag*-Fragment-Plasmiden transfiziert waren, wurde untersucht. Spur 1. pRep-*f1*; Spur 2. pRep-*f2*; Spur 3. pRep-*f3*; Spur 4. pRep-*gag*; Spur 5. NK; Spur 6. Gesamt-RNS aus HIV-1 infizierten MT4-Zellen; Abb. 30 B: Spur 6.+7. mRNA aus infizierten MT4-Zellen 0,1 μg bzw. 0,5 μg .

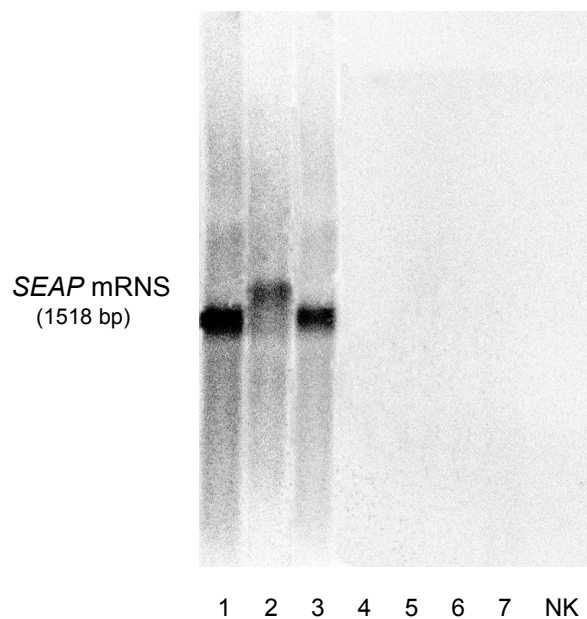


Abb. 26 Northern-Blot Analyse zum Nachweis von SEAP-mRNS und *gag*-spezifischen Transkripten. Aus B-Zellen wurde nach der Transfektion mit Gag-Expressionskonstrukten pBK_{RSV} oder SEAP-Reporterkonstrukten die mRNS isoliert und mit Sonden gegen SEAP- bzw *gag*-mRNS hybridisiert. Spuren 1, 2 und 3 unterschiedliche SEAP-Transkripte: Spur 1 pcmv-SEAP, Spur 2. pBKcmv-SEAP; Spur 3. pRep-SEAP; Spuren 4 bis 7= unterschiedliche *gag*-Transkripte: Spur 4. pbkrsv-*gag*, Spur 4. pBKrsv-*f1*; Spur 5. pBKrsv-*f2*; Spur 6. pBKrsv-*f3*; Spur 7. pBKrsv-*gag*; 8. NK. Es wurden jeweils 2µg mRNS eingesetzt.

Die Hybridisierung mit einer *gag*-DNS Sonde ließ dagegen keine *gag*-spezifischen Banden bei den RNS-Spuren der eingesetzten pBK-*gag* Expressionsplasmide erkennen (Abb. 26, Spuren 4 bis 7). Eine Transkription der *gag*-Sequenzen konnte daher nicht nachgewiesen werden. Die abweichende Größe des Transkriptes bei pBKcmv-SEAP resultierte aus zusätzlichen, nicht translatierten, für bakterielle Expression vorgesehene Nukleinsäuresequenzen stromaufwärts des eukaryotischen Translationsstartpunktes (321 Basen), die in den Plasmiden pBK_{RSV}-SEAP und pRep-SEAP nicht vorhanden waren.

C.3.4. Plasmidisolierung aus stabil transfizierten B-Zellkulturen

Der fehlende Nachweis spezifischer *gag*-Transkripte im vorangegangenen Experiment legte nahe, dass es während der Selektionsphase transfizierter B-Zellen zum Verlust des Plasmides kam. Dennoch war eine Selektion über die Zugabe von Histidinol möglich. Es stellte sich daher die Frage, ob es zur Integration des Histidinol-Resistenzgens ins Wirtszellchromosom kam. Deshalb wurde versucht, die *gag*-DNS in den transfizierten B-Zellen nachzuweisen. Aus B-Zellen, die durch anhaltendes Passagieren über mehrere Monate im Selektionsdruck des Histidinol-Resistenzmarkers angereichert wurden, wurde jeweils Gesamt-DNS aus diesen Zellen

isoliert und mittels Elektrotransformation in elektrokompente *E.coli*-Stämme transfiziert. Diese Methode des Gentransfers ist sehr effizient und ermöglicht auch den Nachweis geringster Plasmidmengen in Gesamt-DNS-Präparationen. Der auf den pRep-Expressionsplasmiden vorhandene bakterielle Selektionsmarker Ampicillin ermöglichte die Isolation positiver *E.coli*-Klone. Nach Vermehrung dieser Klone wurden die jeweiligen Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalysen charakterisiert. Durch Schneiden mit den Enzymen *NheI* und *XhoI* ergaben sich die in Abb. 20 gezeigten charakteristischen Bandenmuster der hergestellten pRep-Expressionsplasmide. Diese konnten somit eindeutig identifiziert werden und waren in den selektionierten B-Zellkulturen auch nach mehrmonatiger Kultivierung als Episome vorhanden. Die mangelnde Proteinsynthese konnte daher nicht auf den Verlust der Plasmide zurückgeführt werden.

Die gleichzeitige Transfektion einer definierten Menge eines pRep8-Kontrollplasmides und die Verwendung von jeweils ca. 1×10^7 B-Zellen für die Isolierung der Gesamt-DNS ermöglichte eine Abschätzung der pRep-Plasmid Kopienzahl je B-Zelle. Für die untersuchten B-Zellkulturen wurde ein Wert von 3 (+/-2) Kopien pro Zelle ermittelt. Der Resistenzmarker Histidinol eignete sich also für die Anreicherung transfizierter B-Zellen und die Plasmide wurden in episomal vorliegender Form bei der Zellteilung weitergegeben.

C.3.5. Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur Rev-Protein unabhängigen Expression von HIV-1 Gag-Proteinfragmenten

Die Klonierung der *gag*-Fragmente in einen sowohl für eukaryotische als auch bakterielle Expression geeigneten Vektor ermöglichte die Synthese von Gag-Proteinsequenzen in *E.coli*. Die Klonierung eines SEAP-Reportergens in den eukaryotischen Expressionsvektor pRep-8 bestätigte die Funktionsfähigkeit des eingesetzten RSV-Promoters. Anschließend wurden HIV-1 *gag*-Sequenzen mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pRep8 in humanen B-Zellen HIV-1 positiver Patienten transfiziert. Innerhalb von drei Wochen wurden positive Transfektanden erfolgreich in Histidinol-Resistenzmedium selektioniert und dannach auf Gag-Proteinexpression untersucht. Methoden wie der Proteinnachweis im Western-Blot, die Immunfluoreszenz sowie im p24-Antigen-ELISA konnten zu keinem Zeitpunkt HIV-1 Gag spezifische Proteinbanden identifizieren. Der Nachweis von mRNS-Transkripten dieser Konstrukte war ebenfalls negativ. In allen Fällen waren aber mRNS-Transkripte kotransfizierter Reporterplasmide mit gleichem Promoter deutlich nachweisbar. In allen untersuchten Fällen gelang auch die Isolation der transfizierten Gag-Expressionsplasmide aus B-Zellkulturen nach mehrmonatiger Kultivierung. Die Plasmide lagen in episomaler Form vor und wurden bei der Zellteilung stabil weitergegeben.

C.4. Transiente Expression von HIV-1 Gag in Cos7-Zellen

Der vorangegangene Abschnitt hat gezeigt, dass sich auch Gag-Proteinfragmente nicht Rev/RRE-unabhängig synthetisieren lassen. Daher wurden in weiterführenden Experimenten mögliche Einflüsse verschiedener funktionaler Bereiche im HIV-Genom auf die Synthese der vollständigen *gag*-Gensequenz analysiert. Auf der einen Seite wurde das RRE Motiv hinsichtlich seiner Länge untersucht. Auf der anderen Seite wurden flankierende nicht translatierte Nukleinsäure-Sequenzen unter besonderer Berücksichtigung der Spleißstellen betrachtet.

Zur Klärung der Bedeutung solcher Sequenzbereiche für die Gag-Synthese wurden verschiedene Gag-Expressionsplasmide hergestellt (siehe Abb. 27) und Cos7-Zellen transfiziert, um mittels Western-Blot und HIV-1 Gag p24-ELISA die Synthese von Gag-Protein zu quantifizieren. Cos7-Zellen wurden eingesetzt, da die Syntheseleistung dieser Zelllinie im Vergleich zu HeLa deutlich höher lag. Die oben beschriebenen Transfektionsexperimente für Luziferase-Reporterstudien waren in Cos7-Zellen nicht durchführbar, da diese Zellen das große T-Antigen des SV-40-Virus enthalten. Dieses führt zu einer verstärkten Expression von Genen, die durch einen SV-40 Promotor reguliert werden, wie es beim Luziferase-Gen im Reporterplasmid der Fall ist (Gluzman, 1981).

C.4.1.1. Klonierung von *gag*-RRE in pcDNA3

Das in Abschnitt C.1 vorgestellte Luziferase-Reporterplasmid pGL-*gag*-RRE₃₃₀ enthält die mit dem RRE-Fragment eingeführte *EcoRI*-Schnittstelle stromaufwärts des RRE-Motivs. Für die Expression der *gag*-Sequenz war dies von Vorteil, da unterschiedlich große RRE-Sequenzen nicht zu einer Veränderung des Abstandes zwischen dem CMV-Promoter und der zu transkribierenden Gag-Sequenz führten. Ein konstanter Kontext zwischen Promoter und Startkodon ist damit gewährleistet, wodurch Auswirkungen auf die Transkriptionseffizienz ausgeschlossen wurden. Die RRE₃₃₀-Sequenz konnte wiederum gegen die Fragmente RRE₅₀₅, RRE₇₃₂ und RRE₈₅₄ ausgetauscht werden. Hierzu dienten die eingeführte *Bss**HII* Schnittstelle im Gegenstrang-Primer zur Amplifikation des RRE und im Gegenstrang-Primer zur Amplifikation von *gag* im Plasmid pGL-*gag*-RRE₃₃₀. Erst nach der Fertigstellung der Plasmide pGL-*gag*-RRE₅₀₅, pGL-*gag*-RRE₇₃₂ und pGL-*gag*-RRE₈₅₄ wurde die jeweilige komplette *gag*-RRE-Sequenz mit Hilfe des Restriktionsenzymes *EcoRI* ausgeschnitten und in pcDNA3-Expressionsvektor umgesetzt. Das Klonierungsschema hierfür ist in Abb. 27 dargestellt. Eine Übersicht der hergestellten Plasmide und ihr Verwendungszweck ist in Tab. 1, Kapitel B zusammengefasst.

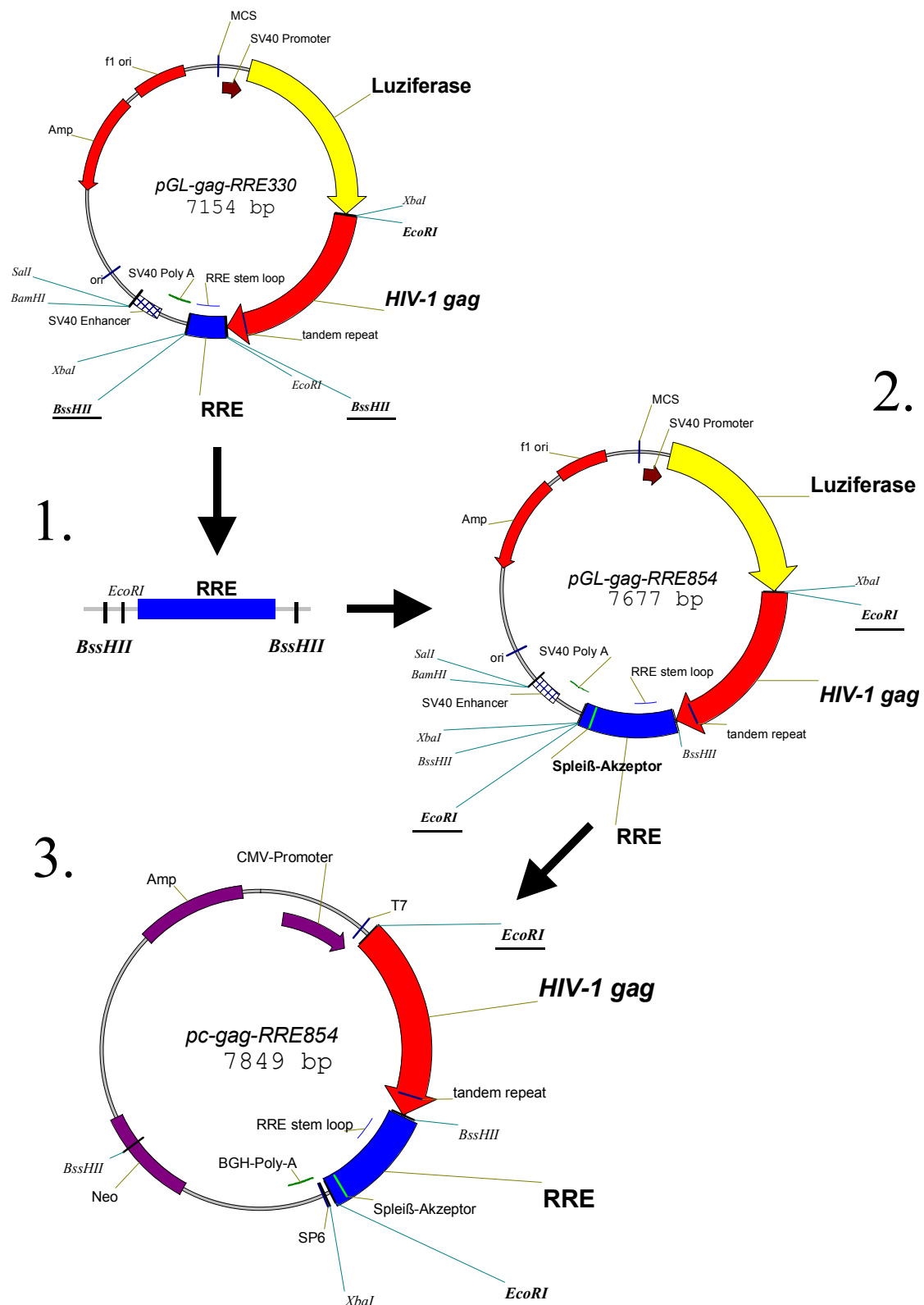


Abb. 27 Klonierungsschema zur Herstellung verschiedener Gag-Expressionsplasmide. Alle gag-RRE Konstrukte wurden zunächst im pGL-Plasmid kloniert (1.). Über die *BssHII*-Schnittstellen wurde anschließend die RRE330-Sequenz gegen die längeren RRE-Sequenzen RRE505, RRE732, RRE854 ausgetauscht (2.). Im letzten Schritt wurden die verschieden langen gag-RRE-Sequenzen mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den pcDNA-Expressionsvektor umgesetzt (3.).

Die Orientierung der eingefügten Sequenzen wurde mittels PCR (Sequenzierprimer T7, SP6, *gag*-Primer und RRE-Primer siehe Tab. 2, Kapitel B) und Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Bam*HI, *Xba*I und *Bss*HII überprüft. Das Insert *gag*-RRE₃₃₀ konnte direkt über die Schnittstelle *Xba*I aus dem Plasmid pGL-*gag*-RRE₃₃₀ ausgeschnitten und in pcDNA3 kloniert werden. Das Plasmid pc-*gag* ohne RRE-Sequenz wurde durch Ausschneiden von *gag* aus pGL-*gag*-RRE₃₃₀ mit dem Enzym *Eco*RI und Ligation in die singuläre *Eco*RI Schnittstelle in pcDNA3 hergestellt. Alle erzeugten *gag*-Expressionsplasmide sind in Abb. 29 zusammengefasst.

Als Negativkontrolle bei der Transfektion der verschiedenen Plasmide diente pc-*gag*(r) mit der *gag*-Sequenz in falscher Orientierung. Weitere *Gag*-Expressionsplasmide mit einer nicht translatierten Region (NTR) von 105 Basen Länge, stromaufwärts des *gag*-Leserahmens gelegen, wurden ebenfalls hergestellt. Hierzu wurde das Ausgangskonstrukt pc-NTR*gag* verwendet (Labor Dr. Ralf Wagner). Die beiden RRE-Sequenzen RRE₃₃₀ bzw. RRE₈₅₄ wurden über eine stromabwärts gelegene *Bam*HI Schnittstelle in dieses Plasmid eingesetzt, nachdem sie aus dem Provirus-Konstrukt HIV-1_{HX10} mittels PCR unter Verwendung der Primer RRE330-expr-fc und RRE330-expr-rc, bzw. den analogen Primern für die RRE₈₅₄-Sequenz amplifiziert wurden. Die *Bgl*II Schnittstelle des 5'-Primers ist mit der *Bam*HI Schnittstelle im pc-NTR*gag* Plasmid kompatibel. Die nach der Ligation entstehenden Plasmide mit der RRE-Sequenz in richtiger Orientierung konnten durch Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Eco*RI und *Bam*HI identifiziert werden (Abb. 27). Die *Eco*RI Schnittstelle war stromaufwärts der NTR-Sequenz gelegen. Die stromabwärts von *Bam*HI gelegene *Xho*I Schnittstelle wurde später für weitere Klonierungen eingesetzt. Die resultierenden Plasmide pc-NTR*gag*-RRE₃₃₀ und pc-NTR*gag*-RRE₈₅₄ enthielten im NTR-Bereich sowie im RRE854-Fragment je eine Spleißdonor- bzw. Spleißakzeptorstelle.



Abb. 28 Ausschnitt aus der stromaufwärts des *gag*-Gens gelegenen NTR-Sequenz mit der darin enthaltenen 5'-Spleißdonorstelle sowie der im *env*-Gen lokalisierten RRE-Sequenz und der hier liegenden 3'-Spleißakzeptorstelle. Die 5'-GT-Basen und die 3'-AG-Basen wurden jeweils durch einen CC-Basenaustausch mutiert.

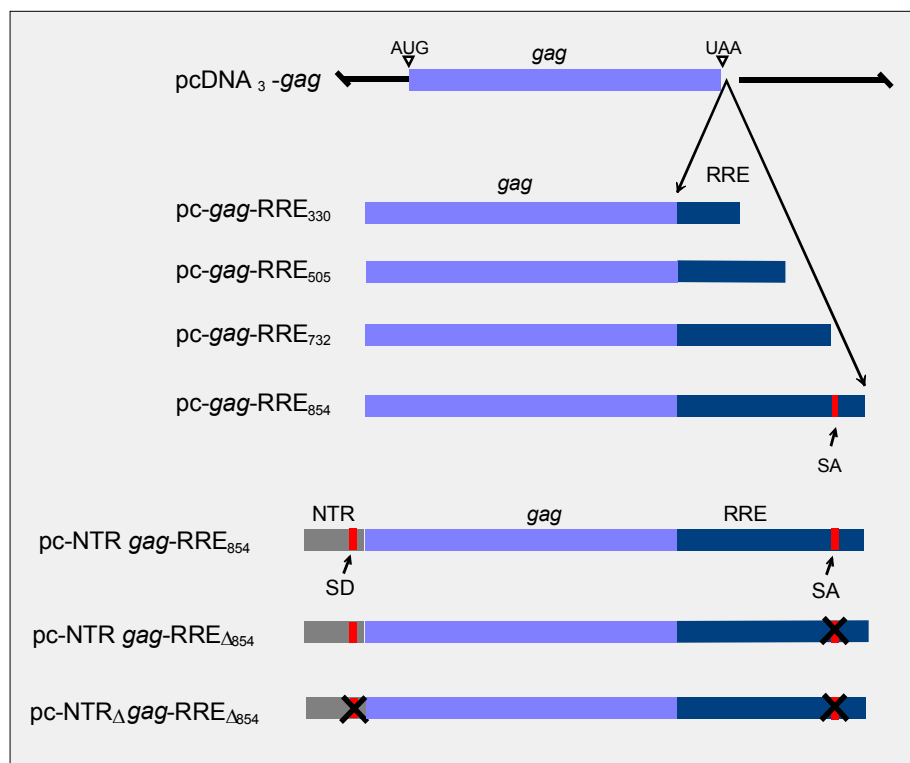


Abb. 29 Übersicht über die verschiedenen pcDNA3-*gag*-Expressionsplasmide. Die letzten drei Konstrukte zusätzlich mit einer nicht translatierten Region (NTR) stromaufwärts des *gag*-Gens und teilweise mutierter Splice-Stellen.

Die *GT*-Basen der Splice-donorstelle sowie die *AG*-Basen der Splice-akzeptorstelle wurden sowohl einzeln, als auch gemeinsam durch Austausch in *CC*-Basen mutiert (siehe Abb. 28), wodurch zwei weitere Plasmide pc-NTRΔ-*gag*-RRE₈₅₄ und pc-NTRΔ-*gag*-RREΔ₈₅₄ entstanden (Δ=Mutation der Splice-Stelle), (Abb. 29).

C.4.1.2. Expression von Gag

C.4.1.2.1. Einfluss verschiedener RRE-Sequenzen auf die durch Rev regulierte Gag-Expression

48 Stunden nach Transfektion der Cos7-Zellen mit verschiedenen *gag*-Expressionsplasmiden wurden die Zellen aus den Kulturschalen geerntet, um die Gag-Proteinsynthese qualitativ und quantitativ zu analysieren. Zunächst wurden die Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers aufgeschlossen und mittels Bradford-Bestimmung die Gesamtproteinmengen der Zellysate ermittelt. Danach wurden alle Proben mit Lysepuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und je 50 µl Zellaufschluss für später durchgeführte p24-Antigen-ELISA-Tests eingefroren. Jeweils 10 µg Gesamtprotein wurden neben dem Proteinstandard auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

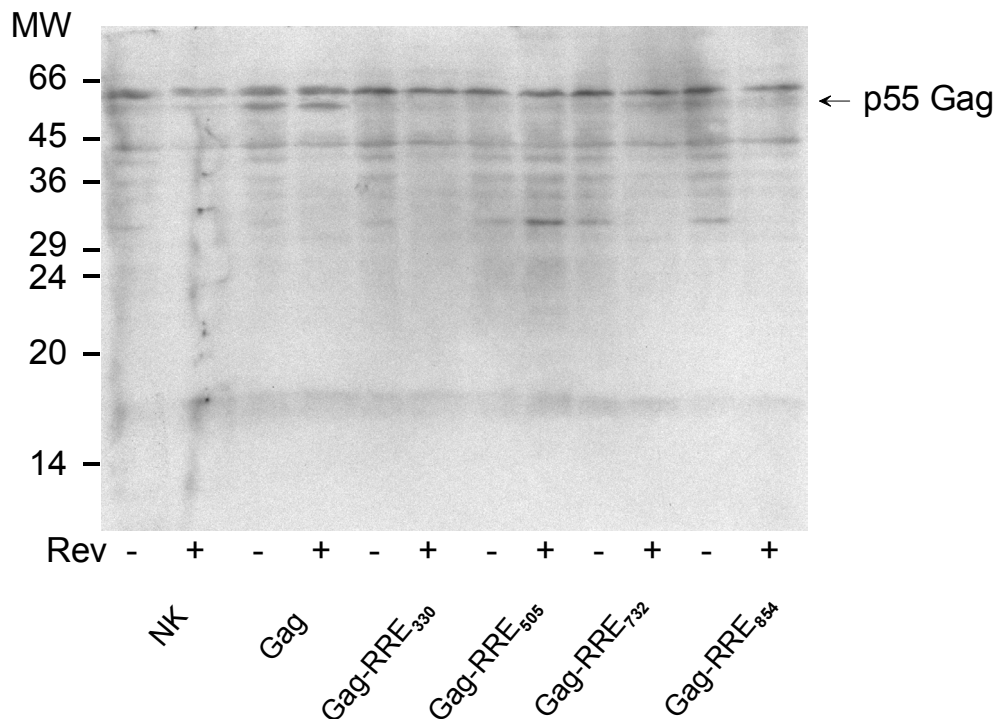


Abb. 30 Western-Blot zum Nachweis der Synthese von Gag-Protein in Cos7-Zellen (1.). Gag-Expressionskonstrukte mit unterschiedlich langen RRE-Sequenzen wurden verwendet, um deren Bedeutung für die Gag-Expression im Zusammenhang mit der durch Kotransfektion von pc-Rev induzierten Expressionssteigerung zu messen. Je Spur wurden 10 µg Gesamtprotein eingesetzt. mAK Gag-13/5 und Gag-16/4/2 gegen HIV-1 Gag.

Im Anschluss daran erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion von Gag-spezifischen Proteinbanden mit den monoklonalen Antikörpern 13/5 und 16/4/2, die beide gegen Gag-Epitope im Übergangsbereich zwischen p17 und p24 gerichtet sind. Mit AP-gekoppelten sekundären Antikörpern wurden die gebundenen mAK sichtbar gemacht. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, war eine Gag-Proteinbande lediglich bei Transfektion des Konstrukts *pc-gag* nachweisbar, unabhängig von einer Kotransfektion des Rev-Expressionsplasmides. Bei allen anderen Konstrukten, die zusätzlich das RRE-Bindemotiv mit unterschiedlichen Sequenzen vor und nach dem RRE enthielten, konnte auch bei Kotransfektion von Rev keine Gag-Proteinexpression gezeigt werden.

C.4.1.2.2. Einfluss von Spleißstellen auf die Effizienz der Gag-Expression

Parallel zu den oben beschriebenen Transfektionen und Proteinanalysen, wurden auch die Expressionskonstrukte mit der dem *gag*-Leserahmen vorgeschaltene NTR-Sequenz, sowie die Konstrukte mit Mutationen in der 3'-Spleißstelle im RRE₈₅₄, bzw. der Mutation der 5'-NTR-

Spleißstelle und der 3'-Spleißstelle untersucht, um die Bedeutung dieser Sequenzbereiche für die Gag-Proteinsynthese bewerten zu können. In Gegenwart von Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen kommt es in der Zelle normalerweise zur Ausbildung des Spleißosomenkomplexes und es finden Spleißvorgänge statt, die in diesem Fall zum Ausschneiden der als Intron erkannten *gag*-RRE-Sequenz führen sollte. Da jedoch vor allem die Spleißakzeptorstellen im HIV-1 Genom nicht genau definiert sind, wie dies z.B. für das Aktin-Gen der Fall ist, ist die Effizienz des Spleißvorganges reduziert. Bei der im *env*-Gen lokalisierten SA-Stelle handelt es sich jedoch um eines der häufiger genutzten Motive. Durch alternatives Spleißen wird sie *in vivo* zur Herstellung verschiedener HIV-1 mRNS-Transkripte aus der ca. 9600 Basen langen Vorläufer mRNS genutzt. Wie die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Western-Blot Analysen in Abb. 31 zeigen, ist dies jedoch bei den hier verwendeten *Gag*-Expressionskonstrukten nicht der Fall. Deutlich ist eine dominante Gag-Proteinbande bei allen Konstrukten zu erkennen, die die NTR-Region vor *gag* enthalten.

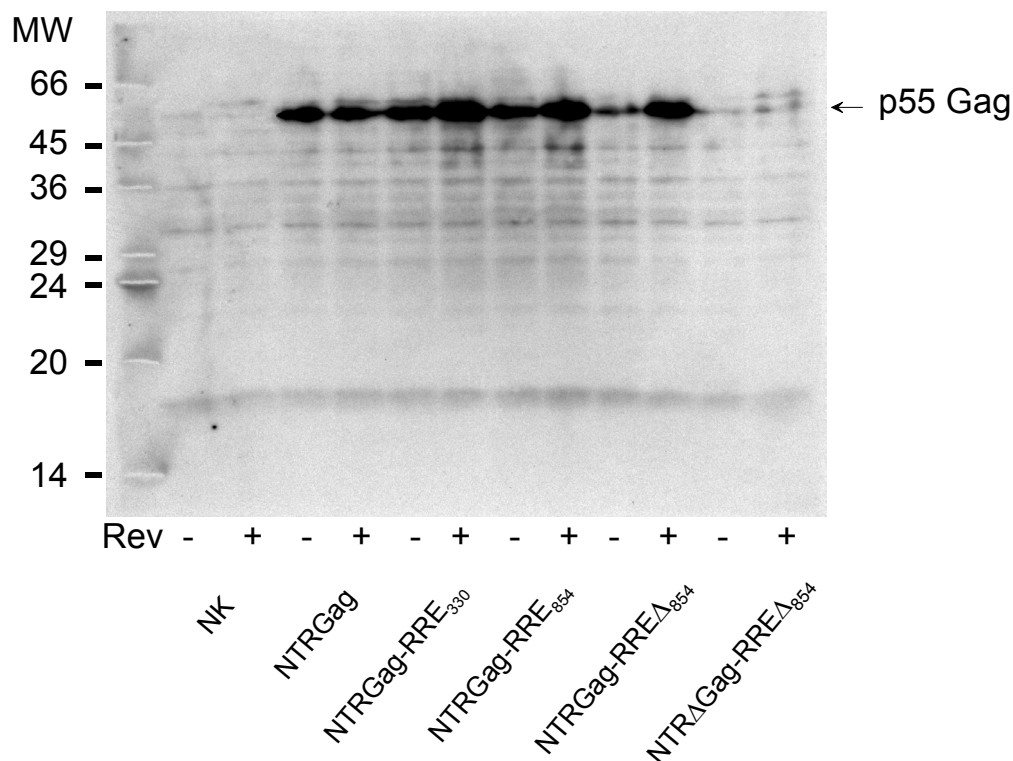


Abb. 31 Western-Blot zum Nachweis der Gag-Proteinsynthese in Cos7-Zellen. *Gag*-Expressionskonstrukte mit einer zusätzlichen nicht translatierten Region NTR und mutierten / nicht mutierten Spleißdonor- und Akzeptorstellen im NTR-Bereich bzw. RRE-Bereich wurden eingesetzt. mAK Gag-13/5 und Gag-16/4/2 gegen HIV-1 Gag. Als Negativkontrolle (NK) diente das Konstrukt pc-*gag*(r) mit der *gag*-Sequenz in falscher Orientierung. Gezeigt sind die Gag-Proteinbanden in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) des Rev-Transporterproteins.

Während die *Gag*-Proteinsynthese beim Konstrukt pc-NTR*gag* sowie bei allen anderen Konstrukten auch ohne die Koexpression des Rev-Transporterproteins bereits beträchtlich ist, führt die Kotransfektion von pc-Rev beim Plasmid pc-NTR*gag*-RRE₃₃₀, pc-NTR*gag*-RRE₈₅₄ und pc-NTR*gag*-RRE Δ ₈₅₄ zu einem weiteren Anstieg von Gag-Protein in den transfizierten Zellen. Die Mutation der SA-Stelle (in den Konstrukten mit Δ bezeichnet) im Plasmid pc-NTR*gag*-RRE Δ ₈₅₄ beeinflusst diese Rev abhängige Steigerung der Gag-Synthese nicht. Jedoch führt die Mutation der SD-Stelle im NTR-Bereich beim Plasmid pc-NTR Δ *gag*-RRE Δ ₈₅₄ zur vollständigen Unterdrückung der Gag-Synthese, unabhängig davon ob Rev-Protein koexprimiert wurde oder nicht. Eine Expressionssteigerung durch Rev-Protein kann nur beobachtet werden, wenn zusätzlich zur *gag*-Sequenz auch das RRE-Motiv im Plasmid enthalten ist. Rev-Protein beeinflusst die *Gag*-Expression beim Plasmid pc-NTR*gag* nicht.

C.4.1.2.3. Quantifizierung der *Gag*-Proteinexpression mittels p24-Antigen-ELISA

Mit den in den vorangegangenen beiden Abschnitten geschilderten transfizierten Zellen wurden zusätzlich ELISA-Tests zum Nachweis von p24-Antigen durchgeführt.

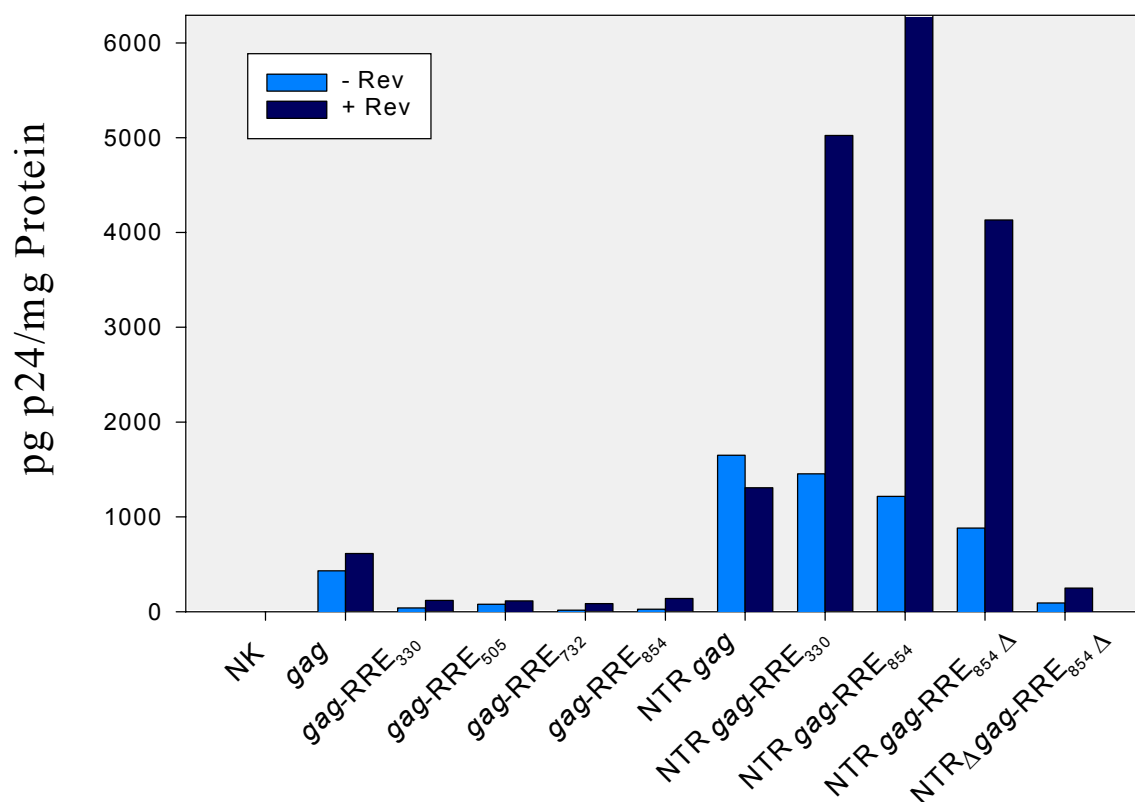


Abb. 32 Darstellung der mittels p24-Antigen ELISA ermittelten Gag-Proteinmengen in transfizierten Cos7-Zellen. Zur Bestimmung wurden jeweils Verdünnungsreihen der Zell-Lysate eingesetzt und die Proteinmenge pg p24/mg Gesamtprotein anhand einer p24-Eichkurve ermittelt.

Mit Hilfe der HIV-1 Gag p24-Eichkurve wurde die p24-Proteinmenge der Zell-Lysate nach Auswertung der ELISA-Daten rechnerisch ermittelt und mit der Gesamtproteinmenge verglichen. Das Verhältnis von pg p24/mg Gesamtprotein ist für alle untersuchten *Gag*-Expressionskonstrukte in Abb. 32 dargestellt. Die ELISA-Daten verdeutlichen nochmals, welchen Einfluss die untersuchten RRE-Sequenzen, der NTR-Bereich, sowie die mutierten Spleißstellen im NTR und im RRE auf die *Gag*-Proteinsynthese haben. Durch den starken CMV-Promoter kommt es bereits ohne die Präsenz der RRE-Sequenz und der Kotransfektion von Rev zu einer basalen *Gag*-Expression (pc-*gag*). Diese wird durch alle zusätzlichen RRE-Sequenzen fast vollständig unterdrückt und kann auch durch Rev-Kotransfektion nicht wesentlich erhöht werden (pc-*gag*-RRE₃₃₀, pc-*gag*-RRE₅₀₅, pc-*gag*-RRE₇₃₂, pc-*gag*-RRE₈₅₄). Erst durch eine zusätzliche NTR, die der *gag*-Sequenz vorgeschaltet ist, wurde ein deutlicher Anstieg der Gag-Synthese erzielt (pc-NTR-*gag*). Die Gegenwart der RRE-Sequenz und die Kotransfektion von Rev kann diese Gag-Synthese weiter deutlich steigern (pc-NTR-*gag*-RRE₃₃₀, pc-NTR-*gag*-RRE₈₅₄). Die Mutation der SA-Stelle im RRE₈₅₄ wirkt sich darauf nur unwesentlich aus. Die SD-Stelle im NTR scheint jedoch von besonderer Bedeutung zu sein, da ihre Mutation sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Rev die Gag-Proteinsynthese gänzlich ausschaltet (pc-NTR-Δ*gag*-RRE₈₅₄).

C.4.2. Kurzzusammenfassung der Ergebnisse zur transienten Expression von HIV-1 Gag in Cos7-Zellen

Verschiedene *gag*-RRE-Konstrukte wurden aus Luziferase-Reporterplasmiden in den Expressionsvektor pcDNA3 mit CMV-Promotor umgesetzt. Weitere Konstrukte wurden durch Klonierung des RRE₃₃₀- bzw. RRE₈₅₄-Fragmentes in das pc-NTR-*gag*-Plasmid hergestellt. Die im NTR lokalisierte SD-Stelle und die im RRE₈₅₄-Fragment befindliche SA-Stelle wurden einzeln oder gemeinsam durch Basenaustausche mutiert. Die verschiedenen *Gag*-Expressionsplasmide wurden entweder alleine oder zusammen mit einem Rev-Expressionsplasmid transfiziert. Die Analysen der Zell-Lysate zeigten im Western-Blot und HIV-1 p24-Antigen-ELISA deutlich, dass eine geringe, basale *Gag*-Expression ohne Rev-Kotransfektion stattfindet. Diese wird durch eine zusätzliche RRE-Sequenz in cis unterdrückt und kann durch Kotransfektion von Rev nicht wieder gesteigert werden. Zusätzliche Sequenzen stromaufwärts oder stromabwärts des RRE₃₃₀-Fragmentes nehmen keinen positiven Einfluss auf die *Gag*-Expression. In Verbindung mit NTR-Sequenzen stromaufwärts von *gag* wird die *Gag*-Expression verstärkt und der Rev/RRE Mechanismus führt zu einer drastischen Expressionssteigerung. Die Präsenz der 5'-SD-Stelle ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Wird dieses Motiv mutiert, so findet überhaupt keine *Gag*-Expression mehr statt. Dagegen zeigt die Mutation der 3'-SA-Stelle im RRE₈₅₄ praktisch keine Wirkung auf eine durch Rev-regulierte Expression.

D. Diskussion

D.1. Entwicklung eines Reporter-Assays zur Bestimmung des Rev-abhängigen mRNS Exportes von *gag*-Transkripten

Die Identifikation funktioneller DNS-Sequenzbereiche im HIV-Genom ist für das Verständnis der Regulation der Vermehrung von HIV von entscheidender Bedeutung. Informationen darüber liefern möglicherweise neue Ansatzpunkte zur Entwicklung wirksamer Therapien oder Impfstoffe, da sich in der Vergangenheit zeigte, dass klassische Immunisierungsversuche bei HIV-Infektionen unwirksam blieben. Als bedeutendes regulatorisches Element im HIV-Genom ist seit langem das durch REV-Protein regulatorisch wirksame RNS-Element RRE bekannt. Diesem RNS-Bindemotiv werden sowohl essentielle Funktionen bei der Transkription als auch bei dem RNS-Export zugeschrieben (Rosen *et al.*, 1985; Cullen, 1986; Cochrane *et al.*, 1990a; Pavlakis & Felber, 1990b). Untersuchungen des HIV-Genoms führten zur Identifikation von AU-reichen Regionen innerhalb der Leserahmen von *gag*, *pol* und *env* (Schwartz *et al.*, 1992a; Nasioulas *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1997). Diese als INS oder CRS bezeichneten Sequenzabschnitte wurden unter Verwendung von CAT- und β -Globin-Reporterassays eingehend untersucht, jedoch führten die daraus gewonnenen Ergebnisse zu widersprüchlichen Aussagen. Während von Pavlakis und Kollegen für die INS eine Rolle in der Regulation des mRNS-Exportes durch eine Destabilisierung der mRNS von HIV-Transkripten postuliert wurde (Schwartz *et al.*, 1992b), ist diese Bedeutung von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen angezweifelt worden (Mikaelian *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde erstmals gezielt die Bedeutung cis-aktiver Sequenzbereiche des HIV-Genoms für die Regulation der Synthese von Gag-Protein mit Hilfe eines neu etablierten Luziferase-Reporter-Systems untersucht. Sequenzbereiche, die stromaufwärts und stromabwärts des RRE-Motivs liegen, sowie Spleiß-Donor- und -Akzeptorsequenzen des HIV-Genoms wurden im Anschluss an die für Luziferase kodierende Sequenz kloniert. Die Ergebnisse aus einer Reihe von unabhängigen Experimenten zur Ermittlung der veränderten Luziferase-Aktivität in Gegenwart verschiedener HIV-Sequenzabschnitte verdeutlichen die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Reportersystems. Insbesondere wurden durch den Einsatz einer internen Transfektionskontrolle und der Standardisierung aller Messungen auf die jeweils ermittelten relativen Enzymaktivitäten systematische und experimentelle Fehler ausgeglichen.

Im Gegensatz zu anderen Reporterassays wurde hier die Enzymaktivität des internen Standards (Renilla Luziferin) und die entsprechende Reporteraktivität (Photinus Luziferin) aus dem identischen Zellysat unmittelbar hintereinander ermittelt. Bei hoher Reproduzierbarkeit und der Ermittlung zweier Messgrößen in nur einem Testsystem, bildete der "Luciferase-Reporterassay" ein ideales Werkzeug, um einen hohen Probendurchsatz zu erzielen und verschiedene Fragestellungen zur Genregulation bei HIV untersuchen zu können. Dieses Reportersystem hat sich bereits bei anderen Anwendungen, z.B. der Charakterisierung funktionell aktiver Sequenzelemente des Parvovirus p6-Promotors (Bond *et al.*, 1997; Gareus *et al.*, 1998) als sehr zuverlässig erwiesen.

Mit der Ermittlung einer Reporter-Enzymaktivität wird jedoch der Einfluss von Sequenzbereichen des HIV-Genoms auf den Export des Reporter-HIV-Fusionstranskriptes nur indirekt gemessen. Für die Auswertbarkeit der Daten wurde zugrundegelegt, dass eine verminderte Enzymaktivität auf den verminderten Export von mRNA zurückzuführen ist. Ebenso wurde ein Anstieg der Enzymaktivität in Gegenwart von RRE in *cis* und dem Rev-Protein in *trans* mit einem erhöhten mRNA-Export gleichgesetzt. Dass die Luciferase-Daten tatsächlich mit dem mRNA-Export korrelierten wurde anhand von Northern-Blot Experimenten bestätigt. In Abhängigkeit der Kotransfektion von Rev war ein deutlicher Anstieg der mRNA-Konzentration in den zytoplasmatischen Fraktionen nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde ohne Rev-Kotransfektion eine erhöhte Konzentration des gleichen Transkriptes in den nukleären Fraktionen nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig die Funktionalität des Tests und bildeten daher die Grundlage für die Erhebung aller weiteren Daten zur Fragestellung dieser Arbeit.

D.2. Einfluss von Sequenzbereichen des HIV-Genoms auf den mRNA-Export

Um die Beteiligung verschiedener Sequenzabschnitte des HIV-Genoms am Export der mRNA und / oder deren Expression zu untersuchen wurden zur Klonierung in bisherigen Arbeiten Sequenzbereiche ausgewählt, die sich aufgrund natürlich vorkommender Schnittstellen im HIV-Genom hierfür eigneten. So klonierten Pavlakis und Kollegen sowie Schwartz und Kollegen *gag*-Sequenzen über eine singuläre Schnittstelle direkt stromaufwärts des Startkodons und schlossen in ihren Untersuchungen eine Haupt-Spleißdonorstelle 205 Basen oberhalb von *gag* aus (Schwartz *et al.*, 1992a). Ebenso wurde zur Überprüfung der Rev-Antwort ein 330 Basen langes RRE-Fragment über die im *env*-Gen lokalisierten Schnittstellen 5' *StyI* und 3' *StyI*

ausgeschnitten. Eine suboptimale Spleißakzeptorstelle, die sich einige hundert Basen stromabwärts befindet, wurde ebenfalls ausgeschlossen. Eventuelle regulatorische Funktionen dieser Spleißmotive wurden in diesen Ansätzen nicht berücksichtigt.

Andere Arbeitsgruppen, wie z.B. Mikaelian und Kollegen (Mikaelian *et al.*, 1996) beschäftigten sich dagegen speziell mit der Bedeutung von Spleißstellen. Als Reportersystem für diese Untersuchungen wurden Chimären bestehend aus dem β -Globin-Gen und HIV-*gag-RRE*-Sequenzen hergestellt. Primär konnten sie zeigen, dass nur in Gegenwart von INS und funktionell aktiven Spleißstellen die β -Globin-Synthese bei Kotransfektion von pc-Rev erhöht war. Ohne Spleißstellen (durch Mutationen verändert) war die β -Globin-Synthese ebenfalls durch Rev-Protein erhöht, jedoch war die Gegenwart von INS-Elementen dabei ohne Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde ein alternativer Ansatz zur Untersuchung der Funktionen von Rev/RRE, INS und autologen HIV Spleißstellen gewählt und ein entsprechendes Reportersystem etabliert.

D.2.1. Rolle der RRE-benachbarten Sequenzregion

In der Vergangenheit beschäftigten sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Identifizierung eines minimal funktionellen RRE. Eine Sequenz von 330 Basen wurde als ausreichend für die Ausbildung der RRE-Schleifenstruktur und optimal für die Rev-Funktion (Felber *et al.*, 1989; Solomin *et al.*, 1990). Sequenzbereiche oberhalb oder weiter unterhalb dieses Motives im *env*-Genbereich wurden nicht näher untersucht. Es stellte sich daher die Frage nach der Bedeutung weiterer Sequenzabschnitte im Bereich des RRE-Fragmentes für den Rev regulierten Export der mRNA oder deren Translation. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden in dieser Arbeit unterschiedlich lange Sequenzbereiche der RRE-Region kloniert und deren Effekt im Reporterassay gemessen.

Zunächst zeigte sich, dass RRE selbst einen inhibitorischen Effekt auf die Reporteraktivität hatte, der in diesem System mit der Länge des RRE korrelierte. Die gemessenen Aktivitäten waren im Vergleich zum Reporterkonstrukt ohne kloniertes RRE-Fragment im Fall des 330 Basen umfassenden RRE₃₃₀ um etwa 40 % und im Fall der 854 Basen langen RRE₈₅₄-Sequenz sogar um mehr als 50 % verringert (Abb. 11, C.1.1.2). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeiten, die eine im gp41 kodierenden Bereich des *env*-Gens, innerhalb der dort lokalisierten RRE-Sequenz gelegene, als CRS-Sequenzen (INS) beschriebene Region für eine reduzierte Reporteraktivität verantwortlich machten. In einem CAT-Reporter-

Testsystem erhielten sie ebenfalls geringere Expressionsraten wenn dieses Fragment im Reportertranskript enthalten war (Nasioulas *et al.*, 1994; Brighty & Rosenberg, 1994).

Die Basalaktivität der *luc*-RRE-*gag*-Konstrukte wurde durch die Länge der RRE-Fragmente nicht wesentlich beeinflusst. Im Gegensatz dazu war die Rev-regulierte Steigerung der Luziferaseaktivität durchaus von der Länge der verwendeten RRE-Sequenz abhängig. Während die Luziferaseaktivität bei RRE₃₃₀ um mindestens das vierfache anstieg, war bei allen anderen Konstrukten die Aktivitätserhöhung auf das zweifache beschränkt. Die optimale Länge von 330 Basen für die Funktion des RRE, wie sie von Solomin und Kollegen (Solomin *et al.*, 1990) gezeigt wurde, konnte daher in diesem Reportertest bestätigt werden. Die verminderte Rev/RRE Funktion des RRE₂₇₀ kann mit dem Fehlen eines Bereiches erklärt werden, der an der Ausbildung der für die Rev-Aktivität notwendigen Bindedomäne beteiligt sein könnte. Die Ergebnisse der RRE-Sequenzbereiche grösser als 330 Basen lassen vermuten, dass weiter stromabwärts der Rev-Bindedomäne in der RRE-Region weiteren Motive vorhanden sind, die die Rev/RRE Funktion negativ beeinflussen. Da sich alle Konstrukte mit RRE grösser als 330 Basen gleich verhalten, liegt es nahe, dass die entscheidenden Motive zwischen 330 und 505 Basen lokalisiert sind.

Messdaten von Konstrukten mit RRE an unterschiedlichen Positionen im Transkript, oder mit der RRE-Sequenz in falscher Orientierung stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeiten. Es wurde gezeigt, dass die Rev/RRE Funktionalität unabhängig von der Positionierung des RRE im Fusionstranskript ist, gleichgültig ob RRE im Intron- oder Exonbereich eines Transkriptes lokalisiert ist. Allerdings findet ein durch Rev vermittelter mRNS-Export nur statt, wenn RRE in richtiger Orientierung vorliegt (Malim *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1999). Ortsunabhängigkeit und Richtungsabhängigkeit der Rev/RRE-Funktion bestätigten nochmals, im Einklang mit den oben diskutierten Northern-Blot Analysen, die Funktionalität des Luziferase-Reporterassays für die hier untersuchten Fragestellungen.

D.2.2. Rolle der INS in *gag*

Seit der Identifizierung AU-reicher Sequenzabschnitte des HIV-Genoms, die wegen ihrer cis-aktiven repressiven Eigenschaften als CRS-Elemente bezeichnet wurden (Cochrane *et al.*, 1991) untersuchten vor allem Schwartz und Kollegen den Sequenzabschnitt der für Gag kodierenden Sequenz eingehend auf die Lokalisation und den Einfluss solcher inhibitorisch wirkender Sequenzen auf den mRNS-Export. Zwei Bereiche INS-1 und INS-2, die im *gag*-Genabschnitt von p17 bzw. im Übergangsbereich von p17 nach p24 lokalisiert sind, wurden als AU-reiche

Motive mit inhibitorischer Wirkung charakterisiert. Zahlreiche stille Mutationen in diesen Motiven von A oder U nach G oder T konnten diesen Effekt weitgehend aufheben. Es wurde daher diskutiert, dass vor allem AU-reiche, für das eukaryotische System ungewöhnliche Sequenzabschnitte in der *gag*-kodierenden Sequenz einen raschen Abbau der mRNA im Zellkern verursachen. Ferner wurde postuliert, dass das Rev/RRE-System mRNA mit hohem AU-Gehalt vor Degradation schützt und dadurch den Export und schließlich die Translation der mRNA ermöglicht (Schwartz *et al.*, 1992a; Schneider *et al.*, 1997). In diesen Studien wurden verschiedene terminal verkürzte *gag*-Fragmente untersucht. Retentionssequenzen innerhalb dieser *gag*-Fragmente, die vermutlich für mRNA-Instabilität verantwortlich waren, wurden ausgetauscht (ohne die Kodonnutzung zu verändern). Die mutierten Fragmente wurden in darauffolgenden Schritten um weitere stromabwärts folgende *gag*-Sequenzen verlängert, um wiederum Stabilitätskriterien der nun verlängerten Fragmente zu untersuchen. Mit dieser Methode wurden die postulierten INS-Elemente, INS-1 und INS-2 definiert.

In den hier diskutierten Versuchen in dieser Arbeit wurden im Gegensatz dazu drei, teilweise überlappende, *gag*-Sequenzbereiche mit jeweils eigenen Startkodons hergestellt. Die drei *gag*-Fragmenten wurde im Reportersystem untersucht, um eine Rev/RRE-abhängige Steigerung des RNS-Exports zu ermitteln. Hierbei war zu beobachten, dass *gag*-Fragment-1, das die postulierte INS-1 enthält, den RNS-Export am stärksten reprimierte und dieser Effekt durch die gleichzeitige Expression von Rev wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 14, C.1.1.2.3). Die *gag*-Fragmente 2 und 3, die Teile des postulierten INS-2 enthalten, zeigten vergleichbar reduzierten RNS-Export aber im Gegensatz zu *gag*-Fragment-1 konnte keine Rev-Abhängigkeit beobachtet werden. Diese Beobachtungen unterstützen die oben erläuterte Hypothese der inhibitorischen Wirkung von INS-1 und INS-2, wobei gezeigt wurde, dass die Kombination von INS-1 und INS-2 den RNS-Export deutlicher reduzierte als die Elemente alleine und diese daher vermutlich synergistisch wirken. Die regulatorische Wirkung von Rev-Protein ist für das *gag*-Fragment 1 deutlich geringer als für die komplette *gag*-Sequenz und für die *gag*-Fragmente 2 und 3 nicht nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Funktion von Rev-Protein im wesentlichen von INS-1 abhängig ist und daher bei den *gag*-Fragmenten 2 und 3, die INS-1 nicht enthalten, nicht zu tragen kommt. Für diese Möglichkeit sprechen Befunde, die eine Interaktion von INS-1 mit zellulären Faktoren postulieren (Afonina *et al.*, 1997). So konnte gezeigt werden, dass das polyA-bindende Protein zur Instabilität oder zum Rückhalt der mRNA im Kern beiträgt (Schneider *et al.*, 1997). Die Bindung von zellulären Faktoren an INS-1 in Verbindung mit einer Interaktion des Rev-Proteins mit dem RRE-Motiv

könnte so zu einer Stabilisierung oder einem verbesserten Kernexport der mRNA führen, in deren Folge die Gag-Synthese erhöht wird. Zur Überprüfung der Frage, ob Rev-Protein die Stabilität der mRNA oder deren Export unterstützt, wurden vergleichende Northern-Blot Analysen durchgeführt. Die Verteilung nukleärer und zytoplasmatischer mRNA wurde in Abhängigkeit von Rev-Protein untersucht (Abb. 16, C.1.2). Für das Luc-RRE₃₃₀-Gag Konstrukt war eine deutliche Zunahme der zytoplasmatischen mRNA bei Kotransfektion von *rev*-Plasmid zu sehen, während die mRNA-Menge im Kern abnahm. Es scheint daher, dass nicht die Stabilität sondern der mRNA-Kernexport durch Rev-Protein positiv beeinflusst wird. Ein durch Rev-Protein erhöhter Export war bei dem Kontrollkonstrukt Luc-RRE₃₃₀ nicht erkennbar. Diese Analyse bestätigte daher die oben erläuterte Vermutung, dass die Funktion von Rev-Protein eng an INS-1 gekoppelt ist.

D.2.3. Rolle der Haupt-Spleißdonorstelle stromaufwärts von *gag*

Um einen möglichen Einfluss des 5'-nicht translatierten Bereichs, mit besonderem Fokus auf die darin enthaltene Spleißdonorstelle zu untersuchen, wurden die *luc*-RRE-*gag*-Konstrukte um diese Region erweitert und im Luziferase-Assay ausgewertet. Ein Spleißakzeptor steht nur in den Konstrukten, die das RRE₈₅₄ enthalten, zur Verfügung. Im *luc*-NTR*gag*-RRE₈₅₄-Konstrukt sind Spleißdonor und Spleißakzeptor in der richtigen Orientierung angeordnet, im *luc*-RRE-NTR*gag*-Konstrukt in vertauschter Orientierung. Es fällt auf, dass bei richtiger Orientierung der Spleißstellen der RNS-Export gegenüber der falschen Orientierung in Abwesenheit von Rev deutlich erhöht ist (ca. 20%) (Abb. 19, C.2.1.3). Diese Abweichung kann auf Spleißereignisse zwischen der Hauptspleißdonorstelle im NTR-Bereich und der suboptimalen Spleißakzeptorstelle in der RRE₈₅₄-Sequenz zurückgeführt werden und korreliert mit der *in vivo* Situation der Spleißvorgänge während der HIV-Replikation. Hier wird der verwendete Spleißakzeptor zu 26% genutzt (Staffa & Cochrane, 1994; O'Reilly *et al.*, 1995). Das Einfügen der NTR (inklusive des Spleißdonors) erhöhte den RNS-Export verglichen mit dem Konstrukt ohne diese Sequenz um 100%, unabhängig davon ob ein Spleißakzeptor vorhanden war. Die NTR hat folglich einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität oder den Export der mRNA und kompensiert teilweise den negativen Einfluss der INS. Der Einfluss auf die mRNA resultiert wahrscheinlich aus einer Interaktion des Spleißdonors mit Elementen des zellulären Spleißapparates, wodurch ein Schutz vor Degradation oder ein verbesserter Export vermittelt wird. Die Kotransfektion von *rev*-Plasmid resultierte in einer Erhöhung der Reporteraktivität bei allen Konstrukten um das vier- bis fünffache, unabhängig davon, ob Spleißstellen vorhanden

waren oder nicht. Die relativ konstante Erhöhung der Reporteraktivität in den bisher bewerteten Experimenten mit den unterschiedlichen *gag*-RRE-Konstrukten unterstützen die aus den mRNS Untersuchungen erstellte Hypothese, dass sich die Funktion der Rev/RRE Interaktion fast ausschließlich auf den Export der mRNS aus dem Zellkern beschränkt und für eine Stabilisierung der mRNS keine Rolle spielt. Diese exklusive Rolle für Rev/RRE wurde bereits von Mikaelian und Kollegen postuliert und später in Mikroinjektionsversuchen bestätigt (Mikaelian *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1999).

Es darf aber nicht ausser Acht gelassen werden, dass ein derartiger Reporterassay ein artifizielles System darstellt, in dem nicht alle regulatorischen Vorgänge erfasst werden. Daher sind mögliche Falschinterpretationen nicht auszuschließen. Um derartigen Artefakten vorzubeugen, wurden Verfahren entwickelt, die auf Reporter verzichten und die Expression des HIV Gag-Proteins nachweisen.

D.3. Expression von Gag-Protein in eukaryotischen Zellen

Für die Überprüfung der bisher gewonnenen Erkenntnisse und ihrer Übertragbarkeit in das entsprechende autologe System wurde anstelle der Luziferase-Reporteraktivität die Expression des HIV-1 Gag-Proteins direkt nachgewiesen und quantifiziert. In vielen bisher veröffentlichten Ergebnissen zur Expression von HIV-1 Gag wurde aus klonierungstechnischen Gründen die *gag*-Sequenz einschließlich der stromaufwärts des Startkodons gelegenen Speißdonorstelle eingesetzt (*Sall*-*Bcl*I-Fragment), ohne deren mögliche Bedeutung in Betracht zu ziehen (Krausslich *et al.*, 1993). Alternativ wurde diese Spleißstelle bewusst deletiert, um ihre Bedeutung für den mRNS-Export aus den Experimenten auszuklammern, wie im Abschnitt D.2. beschrieben (Mergener *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1992b). Diese Studien wurden geplant, um in Analogie zur *in vivo* Situation die Proteinsynthese von Gag in Abhängigkeit des Rev/RRE-regulierten mRNS-Exports zu untersuchen. Aus diesem Grund war die Verwendung des Rev/RRE-Systems obligatorisch.

In einem ersten Versuchsansatz zur Expression von *gag*-Sequenzen in Säugerzellen wurde untersucht, ob für die Gagproteinsynthese auf den Rev/RRE-Mechanismus verzichtet werden kann. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden die im Reportersystem bereits eingesetzten Fragmente der *gag*-Gensequenz (*fl*-3, siehe C1.1.2.) ohne den RRE-Anteil in einen in Zellen episomal vorliegenden Expressionsvektor umklontiert und in Säugerzellen eingebracht.

D.3.1. Expression von *gag*-Sequenzabschnitten in B-Zellen

Die Beschaffenheit des verwendeten Vektors sollte einerseits die Etablierung stabiler Zellkulturen ermöglichen, gleichzeitig sollte der Nachteil der Integration des Fremdgens ins Chromosom der Zielzelle verhindert werden. Deshalb wurde ein vom Epstein-Barr Virus (EBV) abgeleitetes Plasmid verwendet, das bei der Zellteilung episomal an die Nachkommen weitergegeben wird. Da B-Zellen die natürlichen Zielzellen des EBV repräsentieren, lag es nahe, diese Zellen für die *gag*-Expressionsversuche zu verwenden.

Die Fragmentierung von Proteinen, deren Expression, z.B. auf Grund toxischer Eigenschaften problematisch ist, hat sich schon wiederholt als mögliche Alternative erwiesen, um Antiseren herzustellen oder mit Hilfe von Röntgenkristallographie Proteinstrukturen aufzuklären. Die stabile Expression von viralen Proteinfragmenten in HeLa-Zellen ist z.B. für das Sindbis-Virus Nichtstrukturprotein 1 (nsP1), sowie verschiedener Fragmente des nsP1 beschrieben (Li *et al.*, 1997). Diese Proteinabschnitte ließen sich mit Seren, die aus immunisierten Kaninchen gewonnen wurden, sowohl im Western-Blot als auch mittels Immunfluoreszenz eindeutig nachweisen. Für den Versuchsansatz zur Expression von Gag-Protein standen neben monoklonalen Antikörpern gegen p17 und p24 Humansen HIV-positiver Patienten zur Detektion von Gag-Proteinfragmenten zur Verfügung.

Die Transfektion von B-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten führte weder transient noch nach Selektion transfizierter B-Zellen durch Histidinol-Resistenzmedium (Abb. 23a) zu der Expression eines *gag*-Fragmentes (Abb. 24a+b). Weder durch immunhistochemische Detektion, noch durch p24-Antigen-ELISA oder Westernblot-Analysen war ein spezifischer Nachweis des rekombinaten Proteins möglich. Mögliche Ursachen für diese Beobachtung können auf der Ebene des Vektors, der Nukleinsäuresequenz, der mRNA oder der Proteineigenschaften zu suchen sein. Die Funktion des Vektors wurde bestätigt, nachdem in allen etablierten Langzeit-Zellkulturen der jeweils transfizierte Vektor zweifelsfrei reisoliert werden konnte. Die chromosomale Integration des Histidinol-Resistenzgens kann sicher ausgeschlossen werden, da in diesem Fall der Nachweis der transfizierten Plasmide aus Gesamtzell-DNA negativ ausgefallen wäre. Die Nukleinsäuresequenzen aller *gag*-Konstrukte, inklusive der Startkodons, wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt verifiziert. Zur Untersuchung der Exprimierbarkeit der entsprechenden Konstrukte (unter den Gesichtspunkten Kodierung und mRNA-Instabilität) wurden die *gag*-Sequenzen in bakterielle IPTG-induzierbare Expressionsvektoren eingesetzt. Der erfolgreiche Nachweis der Gag-Synthese (Abb. 22) bestätigte zunächst, dass die Nachweismethoden geeignet waren um Gag-Protein im Western-Blot zu erfassen. Ferner konnte

dadurch gezeigt werden, dass Fehler in der kodierenden Sequenz ausgeschlossen waren und die Transkription/Translation nicht gehemmt wurde. Die bakteriellen Expressionsexperimente verdeutlichten mit gewissen Einschränkungen (bakterielle im Gegensatz zu eukaryontischer Proteinsynthese) ebenfalls, dass spezifische Eigenschaften der Proteine, wie die Erkennung durch AK oder die Stabilität nicht beeinflusst waren. Im Unterschied zu Bakterien sind Transkription und Translation in Eukaryonten räumlich getrennte Vorgänge. Da eine Expression der verschiedenen *gag*-Konstrukte in Bakterien auf keiner dieser Ebenen gehemmt wurde und auch alle anderen möglichen negativen Ursachen ausgeschlossen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass der Block in der Expression auf einen reduzierten Kernexport der mRNA zurückzuführen ist, wie er im Luziferaseassay bereits gezeigt wurde. Für das absolute Fehlen der Proteinexpression könnten darüberhinaus zusätzliche Mechanismen verantwortlich sein. Beispielsweise könnte die Methylierung der fremden Plasmid-DNS, die zum Überleben und Vermehrung der Zellen nicht notwendig war, in Betracht kommen (Shpaer & Mullins, 1990). Die erfolgreiche Synthese einer sezernierten Alkalische Phosphatase in B-Zellen mit demselben Vektor und deren mRNA-Nachweis im Northern-Blot (Abb. 26, C.3.3.3) deuten allerdings darauf hin, dass dieser Einfluss auf die Proteinexpression unwahrscheinlich ist. Sehr viel wahrscheinlicher ist, dass die verwendeten HIV-Gensequenzen für das Ausbleiben der Genexpression verantwortlich sind. Die Synthese der Gag-Proteinfragmente könnte andererseits so gering sein, dass ein Nachweis mit den eingesetzten Detektionsmethoden nicht möglich war. Die alternative Methode der Immunpräzipitation, mit der normalerweise eine gezielte Konzentrierung von Protein erreicht werden kann, ließ sich mit den zur Verfügung stehenden Antikörper nicht durchführen.

Im Verlauf dieser Experimente zeichnete sich ab, dass trotz erfolgreicher Etablierung stabil transfizierter B-Zelllinien eine Synthese von Gag-Proteinfragmenten Rev-Protein unabhängig nicht möglich war. Transiente Transfektionsexperimente mit denselben Konstrukten in HeLa-Zellen, die aufgrund ihrer adherenten Eigenschaften sehr effizient und einfach mit einer alternativen Gentransfer-Methode, der DNS-Präzipitation transfiziert werden konnten, führten ebenfalls nicht zu einer Rev-unabhängigen Synthese der Gag-Proteinfragmente.

D.3.2. Die Bedeutung von Spleißstellen für die Expression von Gag

Nachdem eine Rev-unabhängige *gag*-Expression nicht erreicht wurde, war der nächste Schritt konsequenterweise die Untersuchung der verschiedenen regulatorischen Elemente (INS und Spleißstellen) in Verbindung mit dem Rev/RRE-Mechanismus. Verschiedene, teilweise bereits

im Luziferase-Reportersystem untersuchte Kombinationen von *gag*-, RRE- und NTR-Sequenzen wurden für eine Transfektion von Cos7-Zellen in ein entsprechendes Expressionsplasmid (pcDNA-3) kloniert und die intrazelluläre p24-Konzentration von transfizierten Zellen in Abhängigkeit von Rev quantifiziert. Besonders die Bedeutung der in der nicht translatierten Region (NTR) vorhandenen Spleiß-Donorstelle (SD) und der stromabwärts des RRE gelegene Spleiß-Akzeptorstelle (SA) wurde in diesen Versuchen berücksichtigt. Diese Sequenzbereiche wurden, wie bereits oben erwähnt, für Fragestellungen zu ihrer Bedeutung für die Regulation des *gag* mRNS-Exports bisher noch nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den B-Zellen, konnte das *gag*-Konstrukt in Cos7-Zellen erfolgreich exprimiert werden (Abb. 30 und 31). Möglicherweise ist der Vektorhintergrund, mit dem starken CMV-Promotor und einer höheren Plasmid-Kopienzahl, für diesen Unterschied verantwortlich. Ein Vergleich der unterschiedlichen Gag-Expressionen mit den Konstrukten pc-*gag* und pc-*gag*-RRE verdeutlichte den durch instabilisierende Elemente im RRE-Sequenzmotiv verursachten Abfall der Expression. Die Expression der verschiedenen *gag*-RRE-Sequenzen lag nahe an der Sensitivitätsgrenze des Testsystems. Eine Quantifizierung dieser Werte war daher erschwert. Auch in diesen Fällen war die Expression von pc-*gag* bei Kotransfektion von pc-Rev erhöht.

Die NTR-Sequenz wirkte sich stark fördernd auf die Gag-Expression aus. Bei allen Konstrukten, die auch die NTR-Sequenz enthielten, war bei der *gag*-Expression ebenfalls eine durch Rev-Protein induzierte vier- bis fünf-fache Steigerung der Expression zu beobachten (Abb. 32). Jedoch waren die Expressionsraten im Vergleich zu Konstrukten, die keine NTR-Sequenz enthielten, insgesamt deutlich höher. Die im ELISA-Test gewonnenen Daten zur Quantifizierung der *gag*-Expression in Cos7 Zellen bestätigen die im Luziferase-Reporterassay (D.2) bereits diskutierten Aspekte zur RRE-vermittelten Expressionsabnahme ebenso wie die Beobachtung zur Rev-Protein induzierten Erhöhung des mRNS-Exportes und zur stabilisierenden Wirkung der NTR-Sequenzen.

Um die Bedeutung der Spleißstellen zu charakterisieren, wurden diese für eine bessere Vergleichbarkeit nicht aus der Sequenz entfernt sondern durch jeweils zwei gezielte Punktmutationen unbrauchbar gemacht. Der direkte Vergleich dieser Mutanten mit den entsprechenden Ausgangsplasmiden verdeutlicht den enormen Einfluss dieser Motive. Die Mutation des Spleißakzeptors im RRE₈₅₄ resultierte in einer deutlichen Reduktion der *gag*-Expression. Die Rev-Abhängigkeit war von dieser Mutation nicht beeinflusst. Die zusätzliche Eliminierung des im NTR lokalisierten Spleißdonors verringerte die basale Expression praktisch

vollständig auf das Niveau der Konstrukte ohne NTR. Die Koexpression von Rev hatte, wie schon für die Konstrukte ohne NTR gezeigt, einen deutlich reduzierten Einfluss auf die Gag-Synthese. Diese Ergebnisse konnten in ähnlichen Testsystemen bestätigt werden. (Graf *et al.*, 2000). Als Ursache für die Erhöhung der Expression konnte eine gesteigerte Gesamt-mRNS Menge nachgewiesen werden, die wahrscheinlich durch eine Stabilisierung vermittelt wird.

Diese Experimente machen deutlich, dass die Spleißstellen maßgeblich an der Expression von Gag und möglicherweise anderer, ähnlich regulierter HIV-Gene, beteiligt sind. Der Beitrag der einzelnen Komponenten scheint dabei durchaus unterschiedlich auszufallen. Der Spleißakzeptor trägt zu einem gewissen Teil zur Expressionseffizienz, nicht aber zur Rev-Funktion bei. Die Deletion des Hauptspleißdonormotivs in dieser Region identifizierte die SD-Stelle als wichtigen Schalter für die Rev-abhängige Proteinsynthese. Für den 5'-NTR-Bereich bedeutet dieses Ergebnis, dass sich die Funktion dieses Bereichs auf die Anwesenheit des SD reduziert. Fehlt die SD-Stelle, kann auch der restliche Sequenzbereich nicht zu einer erhöhten Expression beitragen.

D.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier gewonnen Erkenntnisse ergänzen die noch immer nicht vollständig verstandene Vorstellung der Zusammenhänge der wesentlichen an der geregelten Expression von Gag beteiligten Faktoren:

INS-Elemente, insbesondere INS-1, sind für die Retention von *gag*-mRNS im Zellkern verantwortlich, indem sie nukleäre Faktoren binden, die den Kernexport der entsprechenden mRNS verhindern und möglicherweise zu einer Degradation dieser mRNS beitragen. Suboptimale Spleißstellen in den Transkripten führen unmittelbar zu einer Erhöhung der Gag-Expression, indem die mit nukleären Faktoren assoziierte mRNS stabilisiert wird, vermutlich unter Beteiligung von Komponenten des Spleißapparates. Die dadurch erreichte Akkumulation der mRNS im Kern führt unmittelbar zu einem Anstieg der zytoplasmatischen mRNS. Das Verhältnis von zellulärer zu nukleärer mRNS ändert sich durch die Funktion des SD nicht. Erst durch die Interaktion von Rev mit RRE wird ein aktiver mRNS Export vermittelt, der auch zu einer verhältnismäßigen Erhöhung des zytoplasmatischen mRNS-Anteils führt. Dieser Rev-abhängige Mechanismus ist dabei von INS-1 abhängig und von den Spleißmotiven unabhängig.

Für eine detailliertere Aufklärung dieses komplexen Regulationsmechanismus ist es wichtig weiterer Faktoren, die an der Stabilisierung und dem Export von Reporter-Fusions- oder Gag-

Expressionstranskripten beteiligt sein könnten, zu identifizieren. Insbesondere Faktoren, die mit dem untersuchten Haupt-Spleißdonor oberhalb von HIV-1 *gag* interagieren, sind von Interesse.

Weiterführende Studien zur Untersuchung der Bedeutung viraler Sequenzmotive für die Stabilität und den Export der viruseigenen Transkripte könnte man alternativ zu Northern-Blot Analysen oder Reporter-Systemen in Zukunft durch die Echtzeit-Quantifizierung nukleärer und zytoplasmatischer Transkripte mit dem Real-Time PCR-Verfahren verfolgen. Diese moderne Methode erzielt unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch an ihre Komplementärsequenz im mRNS-Transkript binden, höchste Genauigkeit und bedarf nur einen Bruchteil der Zeit zur Quantifizierung. Auch wären die mit dieser Methode gewonnenen Daten frei von möglichen zellspezifischen Einflüssen auf die Expression des Reporters und somit auf die untersuchte Fragestellung zu sehen.

Unter Verwendung einer optimierten Kodon-Nutzung, also dem konservativen Austausch zahlreicher AT-reicher Regionen des *gag*-Sequenzbereiches zeigten Schwartz und Kollegen, dass der mRNS-Export von *gag*-Transkripten unabhängig vom Rev/RRE-Mechanismus erfolgte. Die vollständige Übersetzung der HIV-*gag*-Sequenzen unter Berücksichtigung der menschlichen Kodon-Nutzung in ein "synthetisches *gag*-Gen" ermöglichte eine effiziente Rev/RRE unabhängige Expression (Graf *et al.*, 2000). Im wesentlichen entspricht dieser Ansatz der konservativen Umschrift der beschriebenen INS-Elemente in *gag*. Der Einsatz von Syn-*gag* für das in dieser Arbeit vorgestellte B-Zell-Expressionssystem würde die beobachteten Probleme bezüglich der geringen Stabilität von AU-reichen *gag*-Transkripten umgehen und könnte so zu einer effizienten und exklusiven Synthese von Gag-Proteinsequenzen in Abwesenheit zusätzlicher viruseigene Proteine führen. Virale Regulationsmechanismen würden auf diese Weise umgangen. Möglicherweise könnten mit diesem Ansatz weitere bisher nicht identifizierte Gag-Epitope lokalisiert werden und sich so neue Ansatzpunkte für die Bekämpfung von HIV-Infektionen ergeben. Ein Modellsystem zur Identifizierung und Charakterisierung relevanter CTL-Epitope aus dem Spenderblut HIV-1 infizierter Patienten wäre als Alternative zu den sehr oft als "artifizell" diskutierten Vaccinia-Expressions- und Peptidbeladungs-Methoden zur Identifizierung immunologisch bedeutender Epitope zu sehen. Ausserdem würde dies eine "ex-vivo Vermehrung" autologer CTL aus HIV-1 infiziertem Spenderblut in Zellkultur ermöglichen und dadurch neue Wege zur Therapie HIV-infizierter Menschen eröffnen.

E. Literaturverzeichnis

Afonina, E., Neumann, M. und Pavlakis, G. N. (1997): Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J.Biol.Chem.* 272(4), 2307-2311.

Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. und Trono, D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994. 76, 853-864.

Arrigo, S. J. & Chen, I. S. (1991): Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* 5(5), 808-819.

Balter, M. (1998): On World AIDS Day, a shadow looms over southern Africa. *Science* 282(5395), 1790-1791.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599), 868-871.

Bartel, D. P., Zapp, M. L., Green, M. R. und Szostak, J. W. (1991): HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* 67(3), 529-536.

Berkhout, B., Silverman, R. H. und Jeang, K. T. (1989): Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59(2), 273-282.

Berthet-Colominas, C., Monaco, S., Novelli, A., Sibai, G., Mallet, F. und Cusack, S. (1999): Head-to-tail dimers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO J.* 18(5), 1124-1136.

Bertola, F., Manigand, C., Picard, P., Belghazi, M. und Precigoux, G. (2000): Human T-lymphotropic virus type I nucleocapsid protein NCp15: structural study and stability of the N-terminal zinc-finger. *Biochem.J.* 352 Pt 2, 293-300.

Bevec, D., Dobrovnik, M., Hauber, J. und Bohnlein, E. (1992): Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89(20), 9870-9874.

Black, B. E., Holaska, J. M., Levesque, L., Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., Dargemont, C. und Paschal, B. M. (2001): NXT1 is necessary for the terminal step of Crm1-mediated nuclear export. *J.Cell Biol.* 152(1), 141-155.

Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M. und Cullen, B. R. (1998): Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J.Virol.* 72(11), 8627-8635.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. und Cullen, B. R. (1995): Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 82(3), 485-494.

Bohnlein, E., Berger, J. und Hauber, J. (1991): Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J.Virol.* 65(12), 7051-7055.

Bond, V. C., Huang, M. B., Person, B., Hairston, R., Ye, X. Y. und Saltarelli, M. (1997): Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein on reporter gene and host T-cell gene expression. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* 43(7), 995-1005.

- Bour, S., Geleziunas, R. und Wainberg, M. A. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol.Rev.* 59(1), 63-93.
- Braaten, D. & Luban, J. (2001): Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J.* 20(6), 1300-1309.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D. und Hammariskjold, M. L. (1994): A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev- independent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(4), 1256-1260.
- Brighty, D. W. & Rosenberg, M. (1994): A cis-acting repressive sequence that overlaps the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus type 1 regulates nuclear retention of env mRNAs independently of known splice signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(18), 8314-8318.
- Broder, S., Mitsuya, H., Yarchoan, R. und Pavlakis, G. N. (1990): NIH conference. Antiretroviral therapy in AIDS. *Ann.Intern.Med.* 113(8), 604-618.
- Bryant, M. & Ratner, L. (1990): Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87(2), 523-527.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. und Stevenson, M. (1993): A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature* 365(6447), 666-669.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. und Stevenson, M. (1992): Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89(14), 6580-6584.
- Burnette, B., Yu, G. und Felsted, R. L. (1993): Phosphorylation of HIV-1 gag proteins by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 268(12), 8698-8703.
- Buseyne, F., McChesney, M., Porrot, F., Kovarik, S., Guy, B. und Riviere, Y. (1993): Gag-specific cytotoxic T lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Gag epitopes are clustered in three regions of the p24gag protein. *J.Virol.* 67(2), 694-702.
- Cann, A. J. & Karn, J. (1989): Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *Aids* 3 Suppl 1, S19-S34.
- Chang, D. D. & Sharp, P. A. (1989): Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* 59(5), 789-795.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. und . (1986): Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233(4761), 343-346.
- Cochrane, A. W., Chen, C. H. und Rosen, C. A. (1990a): Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87(3), 1198-1202.
- Cochrane, A. W., Golub, E., Volsky, D., Ruben, S. und Rosen, C. A. (1989): Functional significance of phosphorylation to the human immunodeficiency virus Rev protein. *J.Virol.* 63(10), 4438-4440.
- Cochrane, A. W., Jones, K. S., Beidas, S., Dillon, P. J., Skalka, A. M. und Rosen, C. A. (1991): Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J.Virol.* 65(10), 5305-5313.

- Cochrane, A. W., Perkins, A. und Rosen, C. A. (1990b): Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J.Virol.* 64(2), 881-885.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. und . (1986a): Human immunodeficiency viruses. *Science* 232(4751), 697.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. und . (1986b): What to call the AIDS virus? *Nature* 321(6065), 10.
- Coffin, J. M. (1996): HIV viral dynamics. *Aids* 10 Suppl 3, S75-S84.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. A. (1990): Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J.Virol.* 64(6), 3097-3099.
- Cullen, B. R. (1986): Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46(7), 973-982.
- Cullen, B. R. (1991): Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.* 5(10), 2361-2368.
- Cullen, B. R. (1992): Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol.Rev.* 56(3), 375-394.
- Cullen, B. R. (1998): Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249(2), 203-210.
- Cullen, B. R., Hauber, J., Campbell, K., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. und Rosen, C. A. (1988): Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting gene product. *J.Virol.* 62(7), 2498-2501.
- D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E. und Pavlakis, G. N. (1992): The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol.Cell Biol.* 12(3), 1375-1386.
- Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E. und Rusche, J. R. (1989): Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* 342(6251), 816-819.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. und Landau, N. R. (1996): Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381(6584), 661-666.
- Dewar, R. L., Natarajan, V., Vasudevachari, M. B. und Salzman, N. P. (1989): Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant human adenovirus. *J.Virol.* 63(1), 129-136.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. und Paxton, W. A. (1996): HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381(6584), 667-673.
- Emmerman, M., Vazeux, R. und Peden, K. (1989): The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* 57(7), 1155-1165.
- Ernst, R. K., Bray, M., Rekosh, D. und Hammariskjold, M. L. (1997): A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol.Cell Biol.* 17(1), 135-144.

- Escaich, S., Kalfoglou, C., Plavec, I., Kaushal, S., Mosca, J. D. und Bohnlein, E. (1995): RevM10-mediated inhibition of HIV-1 replication in chronically infected T cells. *Hum. Gene Ther.* 6(5), 625-634.
- Farjot, G., Sergeant, A. und Mikaelian, I. (1999): A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J. Biol. Chem.* 274(24), 17309-17317.
- Felber, B. K., Drysdale, C. M. und Pavlakis, G. N. (1990): Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J. Virol.* 64(8), 3734-3741.
- Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. und Pavlakis, G. N. (1989): rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86(5), 1495-1499.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. und Berger, E. A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 272 (5263), 872-877.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. und Luhrmann, R. (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82(3), 475-483.
- Fischer, U., Pollard, V. W., Luhrmann, R., Teufel, M., Michael, M. W., Dreyfuss, G. und Malim, M. H. (1999): Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic Acids Res.* 27(21), 4128-4134.
- Folks, T. M. & Hart, C. E. (1997): The Life Cycle of Human Immunodeficiency Virus Type 1. In *AIDS: Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. Lippincott-Raven.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W. (1997a): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90(6), 1051-1060.
- Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K. G., Fransen, J. und Grosveld, G. (1997b): The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J* 16(4), 807-816.
- Forster, M. J., Mulloy, B. und Nermut, M. V. (2000): Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* 298(5), 841-857.
- Franchini, G., Gurgo, C., Guo, H. G., Gallo, R. C., Collalti, E., Fargnoli, K. A., Hall, L. F., Wong-Staal, F. und Reitz, M. S., Jr. (1987): Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature* 328(6130), 539-543.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1996): Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* 70(1), 341-351.
- Freed, E. O., Orenstein, J. M., Buckler-White, A. J. und Martin, M. A. (1994): Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* 68(8), 5311-5320.
- Fridell, R. A., Bogerd, H. P. und Cullen, B. R. (1996): Nuclear export of late HIV-1 mRNAs occurs via a cellular protein export pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93(9), 4421-4424.
- Fritz, C. C., Zapp, M. L. und Green, M. R. (1995): A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* 376(6540), 530-533.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K. und Seed, B. (1998): Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94(6), 715-725.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. und . (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224(4648), 500-503.

Gamble, T. R., Yoo, S., Vajdos, F. F., von Schwedler, U. K., Worthylake, D. K., Wang, H., McCutcheon, J. P., Sundquist, W. I. und Hill, C. P. (1997): Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278(5339), 849-853.

Gardner, M. B., Rosenthal, A., Jennings, M., Yee, J. A., Antipa, L. und MacKenzie, M. (1994): Passive immunization of macaques against SIV infection. *J.Med.Primatol.* 23(2-3), 164-174.

Gareus, R., Gigler, A., Hemauer, A., Leruez-Ville, M., Morinet, F., Wolf, H. und Modrow, S. (1998): Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J Virol* 72(1), 609-616.

Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B. und Jeang, K. T. (1991): Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251(5001), 1597-1600.

Gelderblom, H. R. (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* 5(6), 617-637.

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. und de Wilde, M. (1989): Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59(1), 103-112.

Giver, L., Bartel, D., Zapp, M., Pawul, A., Green, M. und Ellington, A. D. (1993a): Selective optimization of the Rev-binding element of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 21(23), 5509-5516.

Giver, L., Bartel, D. P., Zapp, M. L., Green, M. R. und Ellington, A. D. (1993b): Selection and design of high-affinity RNA ligands for HIV-1 Rev. *Gene* 137(1), 19-24.

Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1), 175-182.

Gottlieb, M. S. (1986): Immunologic aspects of the acquired immunodeficiency syndrome and male homosexuality. *Med.Clin.North Am.* 70(3), 651-664.

Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Wolf, H. und Wagner, R. (2000): Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J.Virol.* 74(22), 10822-10826.

Guatelli, J. C., Gingeras, T. R. und Richman, D. D. (1990): Alternative splice acceptor utilization during human immunodeficiency virus type 1 infection of cultured cells. *J.Virol.* 64(9), 4093-4098.

Haffar, O. K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S. G. und Bukrinsky, M. (2000): Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J.Mol.Biol.* 299(2), 359-368.

Hammarskjöld, M. L., Li, H., Rekosh, D. und Prasad, S. (1994): Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev-independent if the env region is not defined as an intron. *J Virol* 68(2), 951-958.

Hammerschmid, M., Palmeri, D., Ruhl, M., Jaksche, H., Weichselbraun, I., Bohnlein, E., Malim, M. H. und Hauber, J. (1994): Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J.Virol.* 68(11), 7329-7335.

- Hanly, S. M., Rimsky, L. T., Malim, M. H., Kim, J. H., Hauber, J., Duc, D. M., Le, S. Y., Maizel, J. V., Cullen, B. R. und Greene, W. C. (1989): Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes Dev.* 3(10), 1534-1544.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Elbeik, T., Staprans, S. I., Feinberg, M. B., Cao, Y., Ho, D. D., Yilma, T., Caliendo, A. M., Johnson, R. P., Buchbinder, S. P. und Walker, B. D. (1996): Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 12(7), 585-592.
- Hauber, J., Bouvier, M., Malim, M. H. und Cullen, B. R. (1988): Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 62(12), 4801-4804.
- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M. und Skinner, M. A. (1990): HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem- loop structure located within the Rev response element region. *Cell* 60(4), 685-693.
- Heaphy, S., Finch, J. T., Gait, M. J., Karn, J. und Singh, M. (1991): Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88(16), 7366-7370.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. und Emerman, M. (1994): The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(15), 7311-7315.
- Hirsch, V. M., Dapolito, G., Goeken, R. und Campbell, B. J. (1995): Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5(6), 798-806.
- HIV Infection and AIDS, An Overview (2000): *National Institute Of Allergy And Infectious Diseases* .
- Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., Vilmer, E., Michel, F., Mayaud, C., Autran, B. und Plata, F. (1989): Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J.Immunol.* 142(2), 452-462.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E., Schmitt, I., Stauber, R. H., Lottspeich, F., Jockusch, B. M., Scheer, U., Hauber, J. und Dabauvalle, M. C. (2001): Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J.Cell Biol.* 152 (5), 895-910.
- Hope, T. J., Klein, N. P., Elder, M. E. und Parslow, T. G. (1992): trans-dominant inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev occurs through formation of inactive protein complexes. *J.Virol.* 66(4), 1849-1855.
- Hope, T. J., McDonald, D., Huang, X. J., Low, J. und Parslow, T. G. (1990): Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J.Virol.* 64(11), 5360-5366.
- Indraccolo, S., Feroli, F., Minuzzo, S., Mion, M., Rosato, A., Zamarchi, R., Titti, F., Verani, P., Amadori, A. und Chieco-Bianchi, L. (1998): DNA immunization of mice against SIVmac239 Gag and Env using Rev- independent expression plasmids. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 14(1), 83-90.
- Izaurralde, E. & Mattaj, I. W. (1995): RNA export. *Cell* 81(2), 153-159.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. und Varmus, H. E. (1988): Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331(6153), 280-283.

Johnson, R. P., Hammond, S. A., Trocha, A., Siliciano, R. F. und Walker, B. D. (1994): Induction of a major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response to a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 in seronegative humans immunized with a candidate HIV-1 vaccine. *J.Virol.* 68(5), 3145-3153.

Johnson, R. P., Trocha, A., Yang, L., Mazzara, G. P., Panicali, D. L., Buchanan, T. M. und Walker, B. D. (1991): HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes. Fine specificity of the gag-specific response defined by using unstimulated peripheral blood mononuclear cells and cloned effector cells. *J.Immunol.* 147(5), 1512-1521.

Jones, K. A. & Peterlin, B. M. (1994): Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 717-743.

Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Saetrevik, W. und Haukenes, G. (1994): The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol.Cell Biol.* 14(11), 7436-7444.

Kanestrom, A., Andresen, V., Szilvay, A. M., Kalland, K. H. und Haukenes, G. (1998): Histogrammic recording of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) regulatory protein Rev and nuclear factors. *Arch Virol* 143(2), 279-294.

Kanki, P. J., Barin, F., M'Boup, S., Allan, J. S., Romet-Lemonne, J. L., Marlink, R., McLane, M. F., Lee, T. H., Arbeille, B., Denis, F. und . (1986): New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* 232(4747), 238-243.

Kaplan, A. H., Manchester, M. und Swanstrom, R. (1994): The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.* 68(10), 6782-6786.

Khan, M. A., Aberham, C., Kao, S., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S. und Strebel, K. (2001): Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Is Packaged into the Nucleoprotein Complex through an Interaction with Viral Genomic RNA. *J.Virol.* 75(16), 7252-7265.

Kjems, J. & Sharp, P. A. (1993): The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J.Virol.* 67(8), 4769-4776.

Klenerman, P., Rowland-Jones, S., McAdam, S., Edwards, J., Daenke, S., Lalloo, D., Koppe, B., Rosenberg, W., Boyd, D., Edwards, A. und . (1994): Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* 369(6479), 403-407.

Krausslich, H. G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A. M., Mergener, K., Facke, M., Gelderblom, H. R. und Bosch, V. (1993): Analysis of protein expression and virus-like particle formation in mammalian cell lines stably expressing HIV-1 gag and env gene products with or without active HIV proteinase. *Virology* 192(2), 605-617.

Krausslich, H. G. & Wimmer, E. (1988): Viral proteinases. *Annu.Rev.Biochem.* 57, 701-754.

Legrain, P. & Rosbash, M. (1989): Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57(4), 573-583.

Li, M. L., Wang, H. L. und Stollar, V. (1997): Complementation of and interference with Sindbis virus replication by full-length and deleted forms of the nonstructural protein, nsP1, expressed in stable transfectants of HeLa cells. *Virology* 227(2), 361-369.

- Littaua, R. A., Oldstone, M. B., Takeda, A., Debouck, C., Wong, J. T., Tuazon, C. U., Moss, B., Kievits, F. und Ennis, F. A. (1991): An HLA-C-restricted CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone recognizes a highly conserved epitope on human immunodeficiency virus type 1 gag. *J. Virol.* 65(8), 4051-4056.
- Lu, X. B., Heimer, J., Rekosh, D. und Hammariskjold, M. L. (1990): U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev- regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87(19), 7598-7602.
- Maldarelli, F., Martin, M. A. und Strebel, K. (1991): Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol* 65, 5732-5743.
- Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1991): HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 65(2), 241-248.
- Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1993): Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* 13(10), 6180-6189.
- Malim, M. H., Freimuth, W. W., Liu, J., Boyle, T. J., Lyerly, H. K., Cullen, B. R. und Nabel, G. J. (1992): Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J. Exp. Med.* 176(4), 1197-1201.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. und Cullen, B. R. (1989): The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338(6212), 254-257.
- Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J. und Cullen, B. R. (1990): HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans- activator to its RNA target sequence. *Cell* 60(4), 675-683.
- Marquet, R., Baudin, F., Gabus, C., Darlix, J. L., Mougel, M., Ehresmann, C. und Ehresmann, B. (1991): Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* 19(9), 2349-2357.
- Massiah, M. A., Worthylake, D., Christensen, A. M., Sundquist, W. I., Hill, C. P. und Summers, M. F. (1996): Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly. *Protein Sci.* 5(12), 2391-2398.
- McNeil, A. J. & Gore, S. M. (1996): Statistical analysis of zidovudine (AZT) effect on CD4 cell counts in HIV disease. *Stat. Med.* 15(1), 75-92.
- Mergener, K., Facke, M., Welker, R., Brinkmann, V., Gelderblom, H. R. und Krausslich, H. G. (1992): Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology* 186(1), 25-39.
- Meyer, B. E. & Malim, M. H. (1994): The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 8(13), 1538-1547.
- Meyer, B. E., Meinkoth, J. L. und Malim, M. H. (1996): Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* 70(4), 2350-2359.
- Mikaelian, I., Krieg, M., Gait, M. J. und Karn, J. (1996): Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J. Mol. Biol.* 257(2), 246-264.

- Mills, K. H., Kitchin, P. A., Mahon, B. P., Barnard, A. L., Adams, S. E., Kingsman, S. M. und Kingsman, A. J. (1990): HIV p24-specific helper T cell clones from immunized primates recognize highly conserved regions of HIV-1. *J.Immunol.* 144(5), 1677-1683.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D. und . (1992): p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 7(1), 171-180.
- Miyazaki, Y., Nosaka, T. und Hatanaka, M. (1996): The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23. *Biochimie* 78(11-12), 1081-1086.
- Morikawa, Y., Hockley, D. J., Nermut, M. V. und Jones, I. M. (2000): Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J.Virol.* 74(1), 16-23.
- Nakamura, Y., Kameoka, M., Tobiume, M., Kaya, M., Ohki, K., Yamada, T. und Ikuta, K. (1997): A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine* 15 (5), 489-496.
- Nakielnny, S. & Dreyfuss, G. (1997): Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9(3), 420-429.
- Nakielnny, S. & Dreyfuss, G. (1999): Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99(7), 677-690.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A. S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C. P., Pavlakis, G. N. und Felber, B. K. (1994): Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J.Virol.* 68(5), 2986-2993.
- O'Reilly, M. M., McNally, M. T. und Beemon, K. L. (1995): Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Virology* 213(2), 373-385.
- Ogert, R. A., Lee, L. H. und Beemon, K. L. (1996): Avian retroviral RNA element promotes unspliced RNA accumulation in the cytoplasm. *J.Virol.* 70(6), 3834-3843.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M. und Rosen, C. A. (1990): Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev.* 4(8), 1357-1364.
- Otero, G. C., Harris, M. E., Donello, J. E. und Hope, T. J. (1998): Leptomycin B inhibits equine infectious anemia virus Rev and feline immunodeficiency virus rev function but not the function of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *J.Virol.* 72(9), 7593-7597.
- Pang, S., Taneja, S., Dardashti, K., Cohan, P., Kaboo, R., Sokoloff, M., Tso, C. L., Dekernion, J. B. und Beldegrun, A. S. Prostate tissue specificity of the prostate-specific antigen promoter isolated from a patient with prostate cancer. *Hum Gene Ther* 1995. 6, 1417-1426.
- Pasquinelli, A. E., Ernst, R. K., Lund, E., Grimm, C., Zapp, M. L., Rekosh, D., Hammariskjold, M. L. und Dahlberg, J. E. (1997): The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *EMBO J.* 16(24), 7500-7510.
- Pavlakis, G. (1998): AIDS Research-1998. *Science* 280, 1855-1888.
- Pavlakis, G. N. & Felber, B. K. (1990a): Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol.* 2(1), 20-31.

- Pavlakakis, G. N. & Felber, B. K. (1990b): Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol.* 2(1), 20-31.
- Perez, L. G., O'Donnell, M. A. und Stephens, E. B. (1992): The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J.Virol.* 66(7), 4134-4143.
- Poignard, P., Saphire, E. O., Parren, P. W. und Burton, D. R. (2001): gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu.Rev.Immunol.* 19, 253-274.
- Pollard, V. W. & Malim, M. H. (1998): The HIV-1 Rev protein. *Annu.Rev.Microbiol.* 52, 491-532.
- Pomerantz, R. J., Seshamma, T. und Trono, D. (1992): Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol* 66(3), 1809-1813.
- Purcell, D. F. & Martin, M. A. (1993): Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J.Virol.* 67(11), 6365-6378.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L. L., Mitsuya, H., Liou, R. S., Gallo, R. C. und Wong-Staal, F. (1987): Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3(1), 57-69.
- Riviere, Y. (1994): Virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients infected with the human immunodeficiency virus, HIV-1. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 40 Suppl 1, 45-48.
- Rizvi, T. A., Lew, K. A., Murphy, E. C., Jr. und Schmidt, R. D. (1996a): Role of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) in the propagation of MPMV vectors by genetic complementation using homologous/heterologous env genes. *Virology* 224(2), 517-532.
- Rizvi, T. A., Schmidt, R. D. und Lew, K. A. (1997): Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) functions in a position-dependent manner. *Virology* 236(1), 118-129.
- Rizvi, T. A., Schmidt, R. D., Lew, K. A. und Keeling, M. E. (1996b): Rev/RRE-independent Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element-dependent propagation of SIVmac239 vectors using a single round of replication assay. *Virology* 222(2), 457-463.
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. A. (1985): Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82(19), 6502-6506.
- Rosen, C. A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. A. (1988): Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85(7), 2071-2075.
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A. und Walker, B. D. (1997): Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278(5342), 1447-1450.
- Ruhl, M., Himmelsbach, M., Bahr, G. M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G. K., Probst, H., Bevec, D. und . (1993): Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans- activation. *J.Cell Biol.* 123(6 Pt 1), 1309-1320.
- Saavedra, C., Felber, B. und Izaurralde, E. (1997): The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV- 1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export. *Curr.Biol.* 7(9), 619-628.

Sakuragi, J., Shioda, T. und Panganiban, A. T. (2001): Duplication of the primary encapsidation and dimer linkage region of human immunodeficiency virus type 1 RNA results in the appearance of monomeric RNA in virions. *J.Virol.* 75(6), 2557-2565.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N. (1997): Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J.Virol.* 71(7), 4892-4903.

Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N. (1992a): Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J.Virol.* 66(12), 7176-7182.

Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E. M. und Pavlakis, G. N. (1990a): Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 64(6), 2519-2529.

Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyo, E. M. und Pavlakis, G. N. (1990b): Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J.Virol.* 64(11), 5448-5456.

Schwartz, S., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N. (1992b): Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J.Virol.* 66(1), 150-159.

Shpaer, E. G. & Mullins, J. I. (1990): Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. *Nucleic Acids Res.* 18(19), 5793-5797.

Shu, W., Liu, J., Ji, H., Radigen, L., Jiang, S. und Lu, M. (2000): Helical interactions in the HIV-1 gp41 core reveal structural basis for the inhibitory activity of gp41 peptides. *Biochemistry* 39(7), 1634-1642.

Si, Z., Amendt, B. A. und Stoltzfus, C. M. (1997): Splicing efficiency of human immunodeficiency virus type 1 tat RNA is determined by both a suboptimal 3' splice site and a 10 nucleotide exon splicing silencer element located within tat exon 2. *Nucleic Acids Res.* 25(4), 861-867.

Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E. und Haseltine, W. (1986): A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321(6068), 412-417.

Solomin, L., Felber, B. K. und Pavlakis, G. N. (1990): Different sites of interaction for Rev, Tev, and Rex proteins within the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 64(12), 6010-6017.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90(6), 1041-1050.

Staffa, A. & Cochrane, A. (1994): The tat/rev intron of human immunodeficiency virus type 1 is inefficiently spliced because of suboptimal signals in the 3' splice site. *J.Virol.* 68(5), 3071-3079.

Stauber, R., Gaitanaris, G. A. und Pavlakis, G. N. (1995): Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology* 213(2), 439-449.

Stutz, F. & Rosbash, M. (1994): A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *EMBO J.* 13(17), 4096-4104.

- Tabernero, C., Zolotukhin, A. S., Bear, J., Schneider, R., Karsenty, G. und Felber, B. K. (1997): Identification of an RNA sequence within an intracisternal-A particle element able to replace Rev-mediated posttranscriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 71(1), 95-101.
- Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D. und Frankel, A. D. (1993): RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* 73(5), 1031-1040.
- Terns, M. P., Grimm, C., Lund, E. und Dahlberg, J. E. (1995): A common maturation pathway for small nucleolar RNAs. *EMBO J.* 14(19), 4860-4871.
- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. und Gottlinger, H. G. (1994): Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 372(6504), 363-365.
- Thomas, S. L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D. und Hauber, J. (1998): Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J.Virol.* 72(4), 2935-2944.
- UNAIDS/WHO-2000 (2000):.. In *Global Summary of the HIV/AIDS epidemic*.
- van Baalen, C. A., Klein, M. R., Geretti, A. M., Keet, R. I., Miedema, F., van Els, C. A. und Osterhaus, A. D. (1993): Selective in vitro expansion of HLA class I-restricted HIV-1 Gag- specific CD8+ T cells: cytotoxic T-lymphocyte epitopes and precursor frequencies. *Aids* 7(6), 781-786.
- Venkatesh, L. K. & Chinnadurai, G. (1990): Mutants in a conserved region near the carboxy-terminus of HIV-1 Rev identify functionally important residues and exhibit a dominant negative phenotype. *Virology* 178(1), 327-330.
- Vogel, M., Wittmann, K., Endl, E., Glaser, G., Knuchel, R., Wolf, H. und Niller, H. H. (1998): Plasmid maintenance assay based on green fluorescent protein and FACS of mammalian cells. *Biotechniques* 24(4), 540-2, 544.
- Wagner, R., Fliessbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., von Brunn, A. und Wolf, H. (1992): Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch.Virol.* 127(1-4), 117-137.
- Wagner, R., Leschonsky, B., Harrer, E., Paulus, C., Weber, C., Walker, B. D., Buchbinder, S., Wolf, H., Kalden, J. R. und Harrer, T. (1999): Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. *J.Immunol.* 162(6), 3727-3734.
- Wagner, R., Teeuwssen, V. J., Deml, L., Notka, F., Haaksma, A. G., Jhagjhoorsingh, S. S., Niphuis, H., Wolf, H. und Heeney, J. L. (1998): Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology* 245(1), 65-74.
- Weichselbraun, I., Farrington, G. K., Rusche, J. R., Bohnlein, E. und Hauber, J. (1992): Definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T- cell leukemia virus type I Rex protein activation domain by functional exchange. *J.Virol.* 66(4), 2583-2587.
- Widlak, P., Gaynor, R. B. und Garrard, W. T. (1997): In vitro chromatin assembly of the HIV-1 promoter. ATP-dependent polar repositioning of nucleosomes by Sp1 and NFkappaB. *J.Biol.Chem.* 272(28), 17654-17661.
- Wodrich, H., Schambach, A. und Krausslich, H. G. (2000): Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner. *Nucleic Acids Res* 28(4), 901-910.

- Wolff, B., Cohen, G., Hauber, J., Meshcheryakova, D. und Rabeck, C. (1995): Nucleocytoplasmic transport of the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 is dependent on the activation domain of the protein. *Exp.Cell Res.* 217(1), 31-41.
- Wolff, B., Sanglier, J. J. und Wang, Y. (1997): Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem.Biol.* 4(2), 139-147.
- Worthylake, D. K., Wang, H., Yoo, S., Sundquist, W. I. und Hill, C. P. (1999): Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 55 (Pt 1), 85-92.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H. und Essex, M. (1992): The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J.Virol.* 66(8), 4966-4971.
- Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G. und Green, M. R. (1991): Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine- rich binding motif. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88(17), 7734-7738.
- Zhang, H., Zhang, Y., Spicer, T. P., Abbott, L. Z., Abbott, M. und Poiesz, B. J. (1993): Reverse transcription takes place within extracellular HIV-1 virions: potential biological significance. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 9(12), 1287-1296.
- Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M. und Ho, D. D. (1998): An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391(6667), 594-597.
- Zolotukhin, A. S. & Felber, B. K. (1999): Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J.Virol.* 73(1), 120-127.

Viele haben mich auf diesem Weg unterstützt. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung des modernen Arbeitsplatzes. Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Wolf für sein offenes Ohr auch in persönlichen Anliegen.

Frau Prof. Dr. Susanne Modrow für die Vertretung der vorliegenden Arbeit vor der biologischen Fakultät, die Finanzierung des Projektes und v.a. ihrer Geduld und Ausdauer bei der Fertigstellung! Auch die Tortenfeste und Wandertage halte ich in bester Erinnerung.

Ralf Wagner, Ludwig Deml und Markus Graf für Ihr Interesse an meiner Arbeit, für viele hilfreiche Tips und ihre Diskussionsbereitschaft, der oftmals neue Anregungen für meine Arbeit entstanden.

Fritz Schwarzmann, Thomas Dobner und Hans-Helmut Niller für viele hilfreiche Gespräche und ein stets offenes Ohr.

allen (ehemaligen) MitarbeiterInnen unserer Arbeitsgruppe, **Astrid Brunner, Annette Rohrhofer, Anja Ellenrieder, Ulla Raab, Karin Beckenlehner, Bärbel Kaufmann, Simone Dorsch, Andrea Hemauer, Anja Bühner, Bernhard Kattenbeck, Andreas Gigler, Ralf Gareus und Andreas v. Poblitzki** für Ihre Kollegialität, die freundliche Arbeitsatmosphäre und viele nette Stunden in Lab & Freizeit. Unser Gruppenfoto wird mir immer eine schöne Erinnerung an die "Guten alten Zeiten auf der Beauty-Farm" sein!

Frank Notka und Bärbel Kaufmann für das Coaching und die Motivation in der unendlichen Endphase meiner Dissertation. An der Weihnachts-Gans Tradition und diversen Freizeitaktivitäten sollten wir unbedingt festhalten!

Tom Tuschl und Liane Fredl für die liebe Aufnahme in Göttingen, ihre Motivation & Unterstützung.

Christian Gerdes, Bernhard Kattenbeck, Arne Hengerer, Jochen Decker, Elke Perthen, Peter Groitl, Bernd Leschonsky und viele weitere ungenannte Gastredner für ihre stete Teilnahme an unseren Seminaren im Hörsaal K und die erheiternden Stunden ausserhalb des Labors.

meinen KollegInnen bei Bio-Rad, die nicht locker ließen und mir keine Ausrede ersparten.

Josef Köstler, Holger Melzl und dem Voda für die prompte Erfüllung aller Sequenzierwünsche und die freundliche Unterstützung beim "GCG-Computern".

Barbara Hottenträger und Anette Rohrhofer waren der rettende Anker bei den Arbeiten in der Diagnostik und haben mir viele nützliche Tips gegeben.

Hans-Jörg Linde für seine Unterstützung am Fluoreszenzmikroskop.

Tom Grundler und Peter Neumann für das Brauen beinahe jeder gewünschten Mischung in gewohnter Präzision!

Danken möchte ich auch allen nicht namentlich genannten **Kolleginnen und Kollegen** des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Weihnachtsfeste, Skifoarn im Kühtai, Grillfeiern..... gerne wieder!

Besten Dank auch an die **Mitarbeiter der EDV-Abteilung** sowie zahllose **Zivi-Generationen** für ihre bereitwillige Unterstützung bei allen Problemen rund um die EDV. Der "Tor" Billy und seine zahllosen Sklaven haben es wirklich geschafft Euch in ständiger Bewegung zu halten!

meinen Eltern und meinen treuen Seelen **Bea & Sam**. Viel Zeit, Geduld und Nerven habt Ihr mir entgegengebracht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg, den 6. August 2001

(Jürgen Kern)